

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

**ANA FLÁVIA LAGASSA MILHOLLI**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PATCHED E  
DISTRIBUIÇÃO DE MASTÓCITOS EM TUMORES  
ODONTOGÊNICOS CERATOCÍSTICOS**

VITÓRIA

2014

ANA FLÁVIA LAGASSA MILHOLLI

# **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PATCHED E DISTRIBUIÇÃO DE MASTÓCITOS EM TUMORES ODONTOGÊNICOS CERATOCÍSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karla Loureiro Almeida Coburn.

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liliana Aparecida Pimenta de Barros.

VITÓRIA

2014

ANA FLÁVIA LAGASSA MILHOLLI

# **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PATCHED E DISTRIBUIÇÃO DE MASTÓCITOS EM TUMORES ODONTOGÊNICOS CERATOCÍSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Clínica Odontológica.

Aprovada em 4 de dezembro de 2014.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

-----  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karla Loureiro Almeida Coburn  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

-----  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lílilana Aparecida Pimenta de Barros  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-Orientadora

-----  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Cristina Leite de Sampaio e Spohr  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico este trabalho a minha família,  
que está sempre ao meu lado.

*“Quem teme ao Senhor certamente  
será abençoado assim.” (Sl 128:4)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me abençoar, dando-me a oportunidade de fazer este curso de Mestrado, por sua graça e misericórdia, por me dar forças para continuar e pelas vitórias alcançadas.

Agradeço aos meus pais Ana Lúcia Lagassa Milholli e Flávio dos Santos Milholli por estarem ao meu lado e apoiarem meus sonhos, mesmo nos momentos difíceis, me ajudando a superar os obstáculos. Agradeço as minhas irmãs Larissa e Leandra pelo carinho, preocupação e por torcerem sempre por mim.

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Karla Loureiro Almeida Coburn por me orientar neste trabalho, pelo seu profissionalismo, por sua paciência para comigo, pelos seus ensinamentos e pelo esforço empreendido para solucionar os problemas que surgiram durante o curso.

Agradeço a minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Liliana Aparecida Pimenta de Barros pela co-orientação neste trabalho, por compor a banca de qualificação, pela disponibilidade e pela contribuição na área da Patologia.

Agradeço a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Letícia Nogueira da Gama de Souza por me ajudar durante a execução deste trabalho através de seu conhecimento, pelo apoio durante a licença-maternidade da minha orientadora, por me ajudar na gestão das atividades do laboratório e pelos conselhos que recebi.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Cristina Leite de Sampaio e Spohr por aceitar o convite de compor a banca examinadora de defesa desta dissertação

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos da Silva Pacheco por aceitar o convite de compor a banca de qualificação e pela contribuição científica.

Agradeço ao Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto pelo apoio financeiro, o qual permitiu a compra de reagentes indispensáveis à esta pesquisa.

Agradeço a aluna Brunella Barcelos Nascimento por me ajudar na execução de parte das atividades desta pesquisa, por sua responsabilidade e pelo seu apoio.

Agradeço a aluna Eline Manhães Reid Silva, por me auxiliar em meu treinamento, nas atividades do laboratório e pelo apoio nos momentos difíceis.

Agradeço a aluna Izabela Sinara Silva pela disposição em me ajudar nas atividades laboratoriais e na divulgação e inscrições para congresso.

Agradeço a todos os colegas de laboratório que de certa forma contribuíram com o conhecimento técnico que adquiri.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Nascimento Silva por esclarecer as dúvidas referentes à coleta de dados.

Agradeço aos professores Norberto Francisco Lubiana e Antônio Fabris por terem me recebido na disciplina de Histologia, permitindo que eu acompanhasse as aulas teóricas e práticas e pelo conhecimento transmitido.

Agradeço a funcionária Doralice, que permitiu meu acesso ao prédio da Patologia.

Agradeço aos colegas de mestrado pela ajuda e força que recebi durante o curso.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica por esta oportunidade oferecida aos profissionais da Odontologia, bem como aos professores do programa e seus funcionários, Igor da Silva Erler e Regina Lúcia Salles, pela atenção e disponibilidade.

Agradeço ao Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Tumorigênese, local de execução desta pesquisa, por me permitir o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório Histotécnico pela concessão do espaço físico e equipamentos e às suas funcionárias Luciene, Rafaela e Viviane, pela atenção e disponibilidade.

Agradeço ao Laboratório de Ultra Estrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) e aos seus funcionários e alunos, pela disponibilização do espaço e equipamentos durante meu treinamento.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.



## RESUMO

O Tumor Odontogênico Ceratocístico (KCOT) é um tumor benigno intraósseo, que exibe um comportamento agressivo, com tendência à destruição local, potencial infiltrativo e recidivante. O KCOT também é uma das manifestações da Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular (NBCCS). Evidências mostram que o gene *patched* pode ser um significativo fator no desenvolvimento de KCOTs, por ter sua atividade inativada. O objetivo deste estudo foi realizar uma análise comparativa entre os KCOTs de ocorrência isolada e sindrômica, verificando o padrão de expressão da proteína Patched e o padrão de distribuição de mastócitos. Vinte e oito espécimes de KCOTs registrados no Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) durante o período 2004-2012 foram submetidos à técnica imunohistoquímica para detecção da proteína Patched e corados com Alcian Blue para detecção de mastócitos. Características histopatológicas foram avaliadas. Todos os dados clínicos (gênero, idade, etnia e localização da lesão) foram obtidos dos arquivos. Para análise imunohistoquímica um escore foi adotado. Quanto à expressão quantitativa de patched, encontramos que 77,77% dos KCOTs (sindrômicos e não sindrômicos) apresentaram imunomarcação de escore 4 (entre 76% e 100% de células marcadas). As camadas epiteliais basais e intermediárias constituíram maior marcação quando comparadas à camada superficial. Apenas marcação citoplasmática foi encontrada. As características histopatológicas foram mais evidentes nos tumores sindrômicos, porém, não houve diferença significativa na média de mastócitos encontrada para tumores sindrômicos e não-sindrômicos. Sendo assim, nossos resultados demonstraram uma forte expressão epitelial de Patched em KCOTs, sugerindo que esta proteína parece ser importante para a patogênese destes tumores.

Palavras-chave: Tumor Odontogênico Ceratocístico; Patched; Mastócitos.

## **ABSTRACT**

The Keratocystic Odontogenic Tumor (KCOT) is an intraosseous benign tumor, which displays aggressive behavior, with a tendency to local destruction and infiltrative and recurrent potential. It is also one of the manifestations of the Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome (NBCCS). Evidence shows that the patched gene may be a significant factor in the development of KCOTs by having their activity inactivated. The aim of this study was to perform a comparative analysis between sporadic and syndromic KCOTs by checking the expression pattern of Patched protein and the distribution pattern of mast cells. Twenty-eight specimens of KCOTs recorded in Anatomic Pathology Service (SAP) of the School of Dentistry of the Federal University of Espirito Santo (UFES) during the period 2004-2012 were submitted to immunohistochemical technique to detect Patched protein and stained with Alcian Blue to detect mast cells. Histopathologic features were evaluated. All clinical data (gender, age, ethnicity and location of the lesion) were obtained from the files. For immunohistochemical analysis a score was adopted. Regarding the quantitative expression of patched, we found that 77.77% of KCOTs (syndromic and non-syndromic) showed immunostaining score of 4 (between 76% and 100% of cells stained). The basal and intermediate epithelial layers comprised most of staining compared to the superficial layer. Only cytoplasmic staining was found. The histopathologic features were more evident in syndromic tumors, however, there was no significant difference in mean mast cells found to syndromic and non-syndromic tumors. Therefore, our findings demonstrated a strong epithelial expression of Patched in KCOTs, suggesting that this protein seems to be important for the pathogenesis of these tumors.

**Keywords:** Keratocystic Odontogenic Tumor; Patched; Mast cells.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Localização do KCOT.....	24
Figura 02 - Características histológicas do KCOT .....	25
Figura 03 - Via de sinalização Hedgehog.....	30
Figura 04 - A via SHH-GLI e locais potenciais para bloqueá-la com agentes terapêuticos.....	38
Figura 05 - Mastócito identificado no KCOT .....	41
Figura 06 - Dados gerais dos pacientes portadores de KCOT avaliados.....	57
Figura 07 - Dados clinicopatológicos avaliados.....	59
Figura 08 - Características histopatológicas do KCOT avaliadas.....	61
Figura 09 - Distribuição dos mastócitos nos KCOTs.....	63
Figura 10 - Ilustração do padrão de imunomarcção de Patched com atribuição de scores.....	67

Figura 11 - Imunorreatividade de Patched nas camadas epiteliais.....70

Figura 12 - Imunoexpressão de Patched.....73

Figura 13 - Imunorreatividade de Patched no compartimento celular.....75

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 01 - Média de Mastócitos por campo analisado nas lesões de KCOT sindrômicas e não sindrômicas.....	64
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Escore adotado para avaliação quantitativa da imuno-histoquímica.....	53
Tabela 02 - Escore adotado para avaliação semi-quantitativa da imuno-histoquímica.....	53
Tabela 03 - Características histopatológicas avaliadas nas lesões de KCOT.....	60
Tabela 04 - Comparação entre os valores encontrados para fatores preditivos em KCOTs síndrômicos e não-síndrômicos.....	62
Tabela 05 - Comparação da diferença entre a quantidade média de mastócitos entre os KCOTs síndrômicos e não-síndrômicos.....	64
Tabela 06 - Porcentagem de células marcadas por anticorpo para PTCH em cada KCOT.....	66
Tabela 07 - Agrupamento das lesões analisadas quantitativamente de acordo com o escore estabelecido.....	68
Tabela 08 - Porcentagem de estratos marcados por anticorpo para PTCH em cada KCOT.....	69

Tabela 09 - Agrupamento das lesões analisadas semi-quantitativamente de acordo com o escore estabelecido.....	71
---	----

Tabela 10 - Comparação entre os escores 4 de PTCH encontrados nos estratos do grupo síndrômico e não-síndrômico.....	71
--	----

Tabela 11 - Agrupamento das lesões analisadas semi-quantitativamente de acordo com o escore estabelecido.....	72
---	----

Tabela 12 - Comparação entre os escores 4 para PTCH e os estratos dos KCOTs.....	72
--	----

Tabela 13 – Comparação entre as regiões da lesão e o escore para Patched pelo teste de Mann-Whitney.....	74
--	----

Tabela 14 - Comparação entre os fatores preditivos e o escore para PTCH.....	76
--	----

## LISTA DE SIGLAS

BCC - Carcinoma de Células Basais (do inglês *Basal Cell Carcinoma*)

BMP - Proteína Morfogenética Óssea (do inglês *Bone Morphogenic Protein*)

BSA - Albumina Sérica Bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

DAB - Diaminobenzina 3,3 (do inglês *3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride*)

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra Acético

FGF - Fator de Crescimento Fibroblástico (do inglês *Fibroblast Growth Factor*)

GBC - Carcinoma de Vesícula Biliar (do inglês *Gallbladder Carcinoma*)

GPCR- G - Receptor associado à Proteína G (do inglês *Protein Coupled Receptor*)

HE - Hematoxilina e Eosina

HH - Hedgehog

HIP - Proteína de Interação com Hedgehog (do inglês *Hedgehog Interacting Protein*)

HPE - Holoprosencefalia

HRP - Peroxidase de Rábano (do inglês *Horseradish peroxidase*)

IHQ - Imunohistoquímica

IL-3 - Interleucina 3

IL-6 - Interleucina 6

KCOT - Tumor Odontogênico Ceratocístico (do inglês *Keratocystic Odontogenic Tumor*)

LOH - Perda de Heterozigosidade (do inglês *Loss of Heterozygosity*)

MC - Mastócitos (do inglês *Mast Cells*)

NBCCS - Síndrome do Carcinoma Nevoide Basocelular (do inglês *Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome*)



OMS - Organização Mundial da Saúde

OKC - Ceratocisto Odontogênico (do inglês *Odontogenic Keratocyst*)

PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PTCH - Patched

PTCH1 - Patched 1

SAP - Serviço de Anatomia Patológica

SHH - Sonic Hedgehog

SMO - Smoothened

SUFU - Supressor of Fused

TGF-  $\beta$  - Fator de Crescimento Transformante beta (do inglês *Transforming Growth Factor beta*)

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor alfa*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1 TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO .....	21
2.2 VIA DE HEDGEHOG .....	27
2.2.1 O gene PTCH.....	28
2.2.2 Componentes da via HH .....	34
2.2.3 Inibidores da via HH .....	36
2.3 MASTÓCITOS .....	40
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	46
4.2 COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA .....	46
4.3 COLORAÇÃO COM ALCIAN BLUE .....	47
4.4 TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ) .....	48
4.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS .....	50
4.5.1 Análise das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina .....	51
4.5.2 Análise das lâminas coradas com Alcian Blue .....	51
4.5.3 Análise das lâminas submetidas à Imuno-histoquímica .....	52
4.5.3.1 Análise Quantitativa de Patched .....	52
4.5.3.2 Análise Semi-quantitativa de Patched (imunomarcção de estratos) .....	53
4.5.3.3 Análise de Qualitativa Patched (imunomarcção celular).....	54
4.5.4 Análise Estatística .....	54
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>

5.1 DADOS GERAIS DOS PACIENTES .....	56
5.2 DADOS CLINICOPATOLÓGICOS .....	58
5.3 DADOS HISTOPATOLÓGICOS .....	60
5.4 DISTRIBUIÇÃO DOS MASTÓCITOS NOS KCOTS.....	62
5.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DE PATCHED.....	65
5.6 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE PATCHED (IMUNOMARCAÇÃO DE ESTRATOS).....	65
5.7 ANÁLISE QUALITATIVA DE PATCHED (IMUNOMARCAÇÃO CELULAR).....	74
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>100</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE D .....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE E.....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE F.....</b>	<b>105</b>

## 1 Introdução

Os cistos e tumores odontogênicos compõem um aspecto importante da patologia oral e maxilofacial. Os cistos são encontrados na prática odontológica de forma relativamente comum. Já os tumores odontogênicos são lesões incomuns. Neste contexto, o Ceratocisto Odontogênico (OKC - do inglês *Odontogenic Keratocyst*), antes considerado uma forma diferente de cisto odontogênico do desenvolvimento (NEVILLE et al, 2004), foi reclassificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005 como uma neoplasia benigna intraóssea, sendo denominado atualmente como Tumor Odontogênico Ceratocístico (KCOT- do inglês *Keratocystic Odontogenic Tumor*), devido ao seu comportamento clínico agressivo, com tendência à destruição local, caráter infiltrativo e potencial recidivante (PHILIPSEN, 2005). Grande tem sido o interesse no KCOT, já que evidências mostram que essa lesão pode crescer e atingir grandes dimensões antes de se manifestar clinicamente, além de apresentar uma particular tendência à recidiva após o tratamento cirúrgico (SHEAR & SPEIGHT, 2011).

Multiplicidade de KCOTs também é bem reconhecida na Síndrome do Carcinoma Nevoide Basocelular (NBCCS - do inglês *Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome*), onde a presença desta lesão odontogênica constitui um dos principais critérios de diagnóstico, ocorrendo em 65-100% dos pacientes afetados (GU et al, 2006; HIGH & ZEDAN, 2005).

Estudos demonstraram que o gene Patched-1 (PTCH ou PTCH1), que é mapeado no cromossomo 9q22.3-31 e considerado um gene supressor de tumor está envolvido na etiologia do KCOT (LENCH et al, 1997; BARRETO et al, 2000). PTCH1 codifica um receptor transmembrana para Sonic Hedgehog (SHH) e outras proteínas da via Hedgehog (HH). Normalmente, PTCH1 reprime as funções do efetor de sinalização Smoothened (SMO) (HOOPER & SCOTT, 2005), formando um complexo na membrana da célula, que tem um efeito supressor da transdução do sinal de crescimento. Em casos de PTCH mutado, seu efeito inibitório sobre SMO é perdido, resultando em proliferação e estimulação celular. O ligante SHH ao se ligar a PTCH também interrompe esta inibição, permitindo a transdução do sinal e causando estes mesmos efeitos (MADRAS & LAPOINTE, 2008).

A descoberta de que mutações germinativas de PTCH1 são a causa subjacente da NBCCS levou vários autores a investigar o papel da via HH na patogênese de uma série de tumores associados a essa síndrome, incluindo o KCOT. Posteriormente, mutação genética em PTCH1 foi relatada no epitélio de revestimento dos casos de KCOTs não sídrômicos humanos (BARRETO et al, 2000; OHKI et al, 2004; GU et al, 2006; SUN, LI & LI, 2008).

Acredita-se que a agressividade e alta taxa de recorrência de KCOTs também estejam relacionadas a mutações em PTCH1. Porém, fatores preditivos histológicos têm sido propostos na literatura como elementos relacionados ao comportamento biológico dos KCOTs (SHEAR, 2002; MENDES, CARVALHO & VAN DER WAAL, 2010; COTTOM et al, 2012). Dentre estes fatores, alguns autores (SHEAR, 2002; MENDES, CARVALHO & VAN DER WAAL, 2010) consideram brotamentos epiteliais, cistos-satélite, elevado índice mitótico e inflamação coriônica (KADLUB et al, 2013).

Além disso, dados recentes sugerem que o acúmulo de mastócitos em volta das margens de tumores e a liberação de potentes fatores pró-angiogênicos e angiogênicos por meio destas células pode representar uma interação tumor-hospedeiro que provavelmente favorece a progressão destes (TOMITA et al, 2001; IAMAROON et al, 2003; ELPEK et al, 2001). O estudo do papel de mastócitos em várias lesões tem sido facilitado por análises histoquímicas, tais como coloração com azul de toluidina e alcian blue, que permitem a identificação e a quantificação destas células em tecidos processados (ROBERTS et al., 2000).

Devido ao papel de Patched na tumorigênese, a sua importância levou-nos a investigar os níveis desta proteína em KCOTs sídrômicos e não sídrômicos através de análise imunohistoquímica. Dado o comportamento biológico agressivo dos KCOTs, o estudo de células e de moléculas potencialmente relacionadas à patogênese desses tumores será importante para gerar conhecimento base para o estabelecimento de futuras modalidades terapêuticas mais conservadoras.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Tumor Odontogênico Ceratocístico

A princípio Philipsen, em 1956, introduziu o termo “ceratocisto odontogênico” (OKC - do inglês *Odontogenic Keratocyst*) para todos os cistos que apresentavam queratinização histológica (PHILIPSEN, 1956; POGREL, 2003). Em 1971, a Organização Mundial da Saúde (OMS) rotulou “cisto primordial” e “ceratocisto odontogênico” como sinônimos na classificação internacional de tumores. Características histológicas foram enfatizadas e houve preocupação quanto à alta taxa de recorrência de OKCs (POGREL, 2003). Na identificação do tipo histológico de cistos e tumores da OMS, em 1992, “ceratocisto odontogênico” foi a terminologia preferida para a identificação destas lesões (NEVILLE et al, 2004). Acredita-se que o OKC origina-se do epitélio odontogênico, particularmente da lâmina dentária e seus remanescentes ou também de extensões de células basais do epitélio oral sobrejacente (STOELINGA, 2001; STOELINGA, 2003).

Ao longo dos anos observou-se, contudo, que o ceratocisto odontogênico apresentava um comportamento neoplásico caracterizado pela agressividade local (expressa por um padrão de infiltração nos tecidos circundantes) e uma alta taxa de recorrência (PHILIPSEN, 2005), relatada entre a faixa de 5% a 62% (NEVILLE, et al, 2004) à faixa de 10% a 30% (REGEZI, SCIUBBA & JORDAN, 2008) e tendência à multiplicidade. Isso fez com que a nova Classificação dos Tumores de Cabeça e Pescoço da OMS, divulgada em 2005, modificasse a terminologia do OKC para Tumor Odontogênico Ceratocístico (KCOT - do inglês *Keratocystic Odontogenic Tumor*) incluindo-o na categoria de tumores odontogênicos benignos. Assim, o KCOT é definido pela OMS como um tumor benigno uni ou multicístico intraósseo de origem odontogênica com um revestimento característico de epitélio escamoso estratificado paraqueratinizado e um potencial para comportamento agressivo e infiltrativo (PHILIPSEN, 2005).

Embora a maioria dos KCOTs se apresentem de forma isolada, estes também estão associados à Síndrome do Carcinoma Nevoide Basocelular (NBCCS - do inglês *Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome*), também conhecida como Síndrome de Gorlin-Goltz (NEVILLE, et al, 2004). Trata-se de uma doença rara autossômica dominante (WOOLGAR, RIPPIN & BROWNE, 1987) que se

caracteriza por um espectro de defeitos de desenvolvimento como pequenas depressões palmoplantares, foice cerebral calcificada, sela em ponte, costelas bífidas (HAHN et al, 1996; JOHNSON et al., 1996), face áspera com bossa frontal, fenda labial e/ou palatina, espinha bífida oculta, macrocefalia, polidactilia, anomalias oculares (como estrabismo), meningiomas, rabdomiossarcoma, fibrossarcomas, fibroma cardíaco (LO MUZIO, 2008) e uma predisposição para uma série de diferentes neoplasias, tais como carcinomas de células basais (BCCs - do inglês *Basal Cell Carcinoma*), múltiplos tumores odontogênicos ceratocísticos (KCOTs) e meduloblastoma (REGEZI, SCIUBBA & JORDAN, 2008). Mais de 99% dos pacientes com a NBCCS são brancos e 95% estão entre as idades de 40 e 79 anos (ZEDAN et al, 2001). Em pacientes sindrômicos, KCOTs são mais frequentes e recorrem mais rápido e mais comumente, exibindo um comportamento mais "agressivo" (BRANNON, 1976). A prevalência da síndrome é estimada de um para 60 000 (HIGH & ZEDAN, 2005).

KCOTs podem ocorrer tanto na mandíbula quanto na maxila, mas afetam a mandíbula mais frequentemente, com uma proporção de 2:1 (ERYILMAZ et al, 2009), sendo localizados principalmente no corpo posterior, região de ângulo e ramo ascendente (BRANNON, 1976; AHLFORS, LARSSON & SJOGREN, 1984) (Figura 01). Eles estão presentes em uma ampla faixa etária, com pico entre a 2ª e 3ª década de vida e são mais comuns em homens (SHEAR & SPEIGHT, 2011). A idade média relatada por vários autores varia de 38 anos a 40 anos (BRANNON, 1976; WOOLGAR, RIPPIN & BROWNE, 1987). Para os pacientes com múltiplos tumores da NBCCS, a média de idade é de 26,2 anos (WOOLGAR, RIPPIN & BROWNE, 1987), sendo que KCOTs sindrômicos ocorrem mais precocemente do que as variantes não-sindrômicas (LEITE, MEIRELLES JR. & JANINI, 2011).

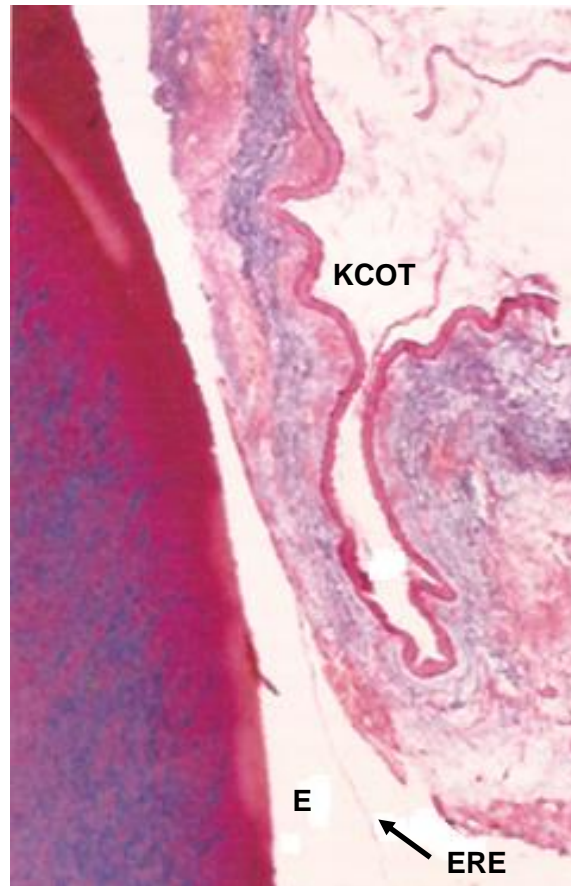
A ocorrência extraóssea de um KCOT é extremamente rara (MENDES, CARVALHO & VAN DER WAAL, 2010). Além disso, estes tumores são assintomáticos e, portanto, detectados somente por achados radiológicos ocasionais (LI, 2011), sendo que, radiograficamente, a lesão aparece como uma radiolucência unilocular ou multilocular bem definida (GONZÁLEZ-ALVA et al, 2008), rodeada por margens suaves ou recortadas com bordas escleróticas (MAURETTE, JORGE & DE MORAES, 2006). Contudo, outras lesões podem exibir características similares (BOFFANO, RUGA & GALLESIO, 2010), como cisto

dentígero, cisto radicular, cisto residual, cisto periodontal lateral e cisto globulomaxilar (não mais considerado como entidade verdadeira). Os KCOTs da linha média anterior da maxila podem mimetizar cistos do ducto nasopalatino. Exemplos de KCOTs periféricos em tecidos moles gengivais já foram relatados (porém tal ocorrência é rara). Sendo assim, o diagnóstico de KCOT é feito com base nas características histopatológicas (NEVILLE et al, 2004).

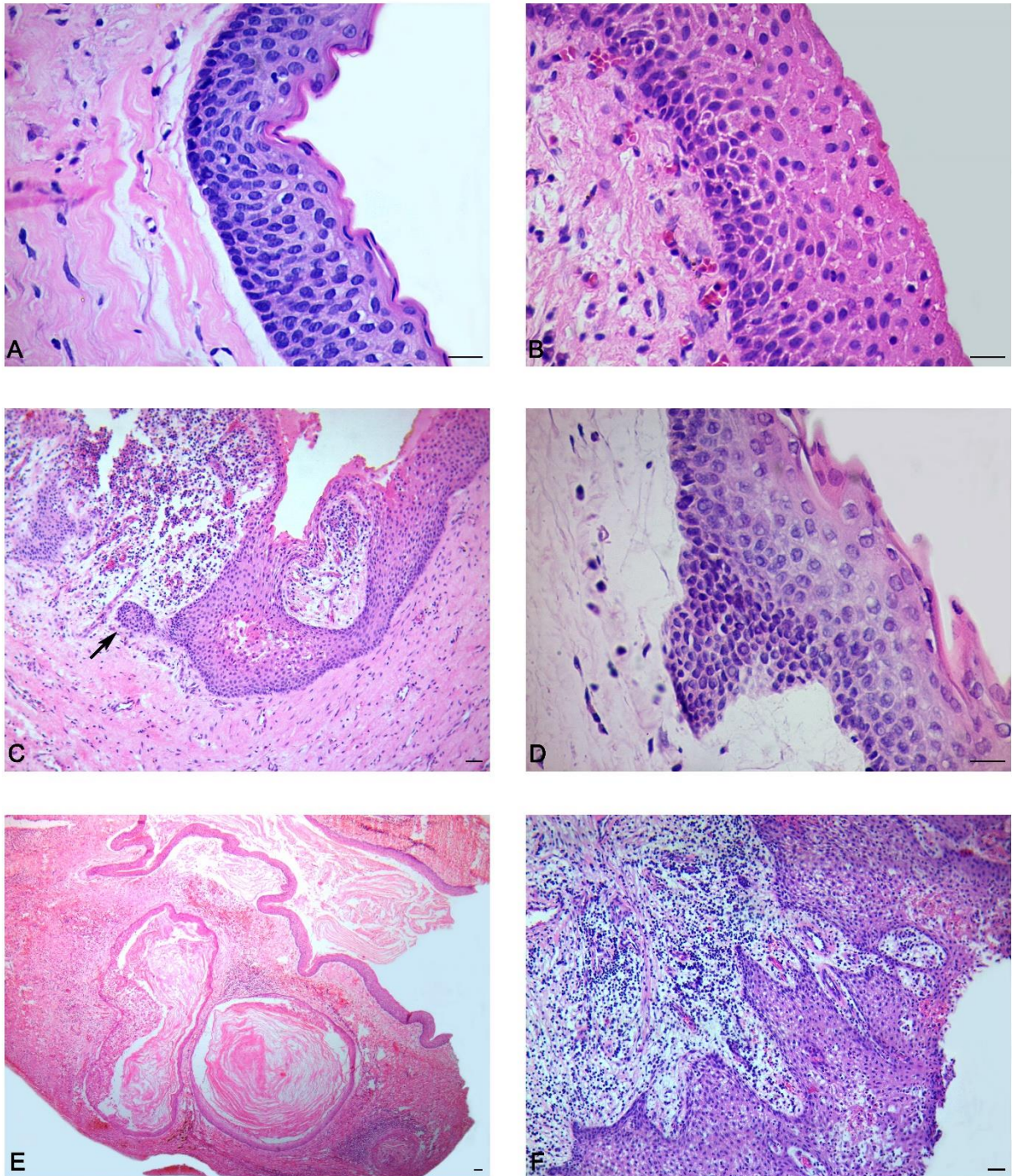
Pacientes com KCOTs podem queixar-se de dor, tumefação ou drenagem de secreção. Eventualmente, os pacientes acometidos podem relatar parestesia do lábio e dentes inferiores. Em diversos casos, os pacientes não apresentam sintomatologia até os tumores atingirem dimensões consideráveis, envolvendo o seio maxilar e todo o ramo ascendente da mandíbula, incluindo os processos condilar e coronóide, podendo desenvolver fraturas patológicas. O KCOT cresce através da medula óssea, sendo que a expansão cortical detectável clinicamente só ocorre tardiamente (SHEAR & SPEIGHT, 2011).

Dentre as características histológicas típicas dos KCOTs, encontramos: um revestimento fino e uniforme de epitélio escamoso estratificado com uma tendência ao destacamento a partir da cápsula de tecido conjuntivo subjacente; uma camada superficial fina e ondulada de paraqueratina; uma camada de células espinhosas, com 4 a 8 células de espessura, apresentando edema intracelular frequente; uma camada regular de células colunares basais com núcleo em paliçada; uma junção epitélio-conjuntivo linear geralmente desprovida de cristas epiteliais, e uma cápsula fibrosa relativamente fina que na sua maior parte não apresenta infiltrado de células inflamatórias (LI, 2011) (Figura 02). Os núcleos das células colunares basais tendem a uma orientação distante da membrana basal e muitas vezes são intensamente basofílicos. Figuras mitóticas são encontradas com frequência nas camadas suprabasais (AHLFORS, LARSSON & SJOGREN, 1984). Quando há infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, as características típicas do KCOT podem ser perdidas (PHILIPSEN, 2005; STOELINGA, 2001). O lúmen cístico pode conter um líquido claro semelhante a transudato seroso ou pode estar preenchido por um material caseoso que, ao exame microscópico, consiste em restos de ceratinócitos (NEVILLE et al, 2004).





**Figura 01: Localização do KCOT.** O KCOT envolveu um dente não irrompido. O tumor encontra-se externo ao espaço do esmalte (E) e epitélio reduzido do esmalte (ERE) (seta). Coloração com Picromallory. **Adaptado de SHEAR & SPEIGHT, 2011.**



**Figura 02: Características histológicas do KCOT.** Camada de células basais colunares ou cubóides com núcleo em paliçada, epitélio estratificado paraqueratinizado, com superfície corrugada, junção entre o tecido epitelial e conjuntivo desprovida de cristas epiteliais e com tendência à separação (A). Ausência de núcleos basais em paliçada e camada paraqueratinizada (B). Presença de infiltrado inflamatório e ilha de epitélio odontogênico (seta) (C). Presença de brotamento da camada basal para o tecido conjuntivo subjacente (D). Presença de cistos-satélite ou cistos-filha (E). Presença de infiltrado inflamatório com perda das características histológicas típicas do KCOT (F). Coloração com Hematoxilina & Eosina. Barra de escala: 20 µm.

O epitélio pode apresentar brotamento da camada basal para o tecido conjuntivo subjacente, com formação de microcistos destacados, denominados cistos-satélites (ou cistos-filha) (REGEZI, 2002).

Alguns estudos têm sugerido que paraqueratinização, ilhas epiteliais e cistos-satélites são uma observação mais freqüente entre KCOTs associados com a NBCCS (AULUCK & PAI, 2006; TODD, 2003). Em um estudo de Kadlub et al, todos os cistos-filha foram associados à recorrência do tumor e confirmaram o valor preditivo deles para agressividade. Para estes autores, parece que o revestimento epitelial origina um cisto-filha de acordo como seguinte curso natural: a inflamação local, a proliferação suprabasal, brotamento epitelial, formação de ilhas epiteliais coriônicas, e em seguida, a formação de cistos-filha (KADLUB et al, 2013). Outro estudo confirma o valor preditivo da presença de cisto-filha para agressividade (JORDAN, 2003).

O epitélio pode ocasionalmente mostrar características de displasia do epitélio e transformação maligna em carcinoma de células escamosas, que embora rara, tem sido relatada (MAKOWSKI , MCGUFF & VAN SICKELS, 2001). Três variantes histológicas do OKC foram identificadas: paraqueratinizada, ortoqueratinizada e uma combinação de ambas, embora na recente classificação da OMS (2005), somente a variante paraqueratinizada seja considerada como um KCOT (GONZÁLEZ-ALVA et al, 2008).

O tratamento dos KCOTs permanece controverso. Várias modalidades, conservadoras e agressivas, têm sido relatadas. O tratamento conservador geralmente inclui enucleação e descompressão ou marsupialização. Já o tratamento agressivo inclui osteotomia periférica e ressecção (BOFFANO, RUGA & GALLESIO, 2010). A injeção intraluminal de solução de Carnoy tem sido utilizada para liberar o cisto de sua parede óssea, permitindo, portanto, maior facilidade de excisão, com uma taxa menor de recidivas. Na descompressão (através da inserção de um dreno de polietileno para permitir a descompressão e a subsequente redução do tamanho da cavidade cística), ocorre um espessamento do revestimento cístico, permitindo uma remoção mais fácil, também com uma taxa de recidiva aparentemente mais baixa. Muitos cirurgiões recomendam a osteotomia periférica da cavidade óssea com uma broca para osso para reduzir a

frequência de recidivas. Outros defendem o uso da solução de Carnoy após a remoção cística (esta provoca uma cauterização química da cavidade óssea) (NEVILLE et al, 2004).

Independentemente da opção de tratamento, tanto o acompanhamento clínico quanto radiográfico continuam a ser obrigatórios após a realização da cirurgia, pois a recorrência pode ocorrer muitos anos depois (MENDES, CARVALHO & VAN DER WAAL, 2010). De acordo com Stoelinga, o período de acompanhamento de KCOTs deve ser de pelo menos uma vez por ano, durante 5 anos após o tratamento inicial (STOELINGA, 2001).

## 2.2. Via de Hedgehog

A via de sinalização Hedgehog (HH) é uma via de desenvolvimento que foi originalmente identificada durante a pesquisa embrionária na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (NUSSLEIN-VOLHARD & WIESCHAUS, 1980; TANG, 2011). Estudos posteriores mostraram que esta via é fundamental para a formação adequada dos segmentos em embriões de *Drosophila*, determinando o eixo corpóreo ântero-posterior (PEIFER & BEJSOVEC, 1992; TANG, 2011).

Os genes Hedgehog são altamente conservados da mosca da fruta ao ser humano e hoje são considerados como reguladores-chave do desenvolvimento embrionário (VARJOSALO & TAIPALE, 2008). Em insetos, a sinalização HH controla a correta segmentação e desenvolvimento das asas; nos vertebrados induz a assimetria direita-esquerda e correta formação dos membros, esqueleto, músculos, pele, olhos, pulmões, dentes, sistema nervoso, intestinos e a diferenciação dos espermatozóides e cartilagem (HERETSCH, TZAGKAROULAKI & GIANNIS, 2010). Em glândulas mamárias, a via HH é rigorosamente controlada para assegurar o desenvolvimento normal destas e prevenir carcinogênese. Sinalização de HH em células de mamíferos é mediada por ligantes de HH tais como Sonic Hedgehog (SHH) (PASCA DI MAGLIANO & HEBROK, 2003). A sinalização Sonic Hedgehog/Patched controla o destino das células, padronização e crescimento de numerosos tecidos, incluindo dentes (BITGOOD & MCMAHON, 1995), determinando seu crescimento e forma (DASSULE et al., 2000).



Atividade pós-embrionária da via de sinalização Hedgehog é normal somente em folículos pilosos e a células da pele, em que esta via de sinalização leva a sua manutenção (TANG, 2011). Em adultos, a via de HH permanece ativa em um determinado número de células-tronco e durante a regeneração de tecidos (EPSTEIN, 2008; HERETSCH, TZAGKAROULAKI & GIANNIS, 2010). Em todas as outras células (com exceção das células-tronco) a via não está mais ativa (TANG, 2011). Nos seres humanos, perda da função Hedgehog durante o desenvolvimento pode ter efeitos graves, resultando muitas vezes em holoprosencefalia (HPE), uma condição em que há uma separação insuficiente dos hemisférios cerebrais (MAHINDROO, PUNCHIHEWA & FUJII, 2009).

Novas evidências sugerem claramente que a ativação da via de HH tem sido implicada na tumorigênese de um grande número de cânceres humanos, incluindo meduloblastoma, carcinomas basocelulares, leucemia, câncer pulmonar, gastrointestinal, de ovário, de mama e de próstata (BERMAN, KARHADKAR & MAITRA, 2003; MA, CHEN & HUANG, 2005; THAYER, DI MAGLIANO & HEISER, 2003; YANAI, NAGAI & WADA, 2007). Porque HH desempenha um papel central no controle da proliferação e diferenciação de células-tronco embrionárias e células-tronco adultas, a ativação aberrante de sinalização HH pode levar à geração de células-tronco cancerosas e desenvolvimento de câncer (HE et al., 2012).

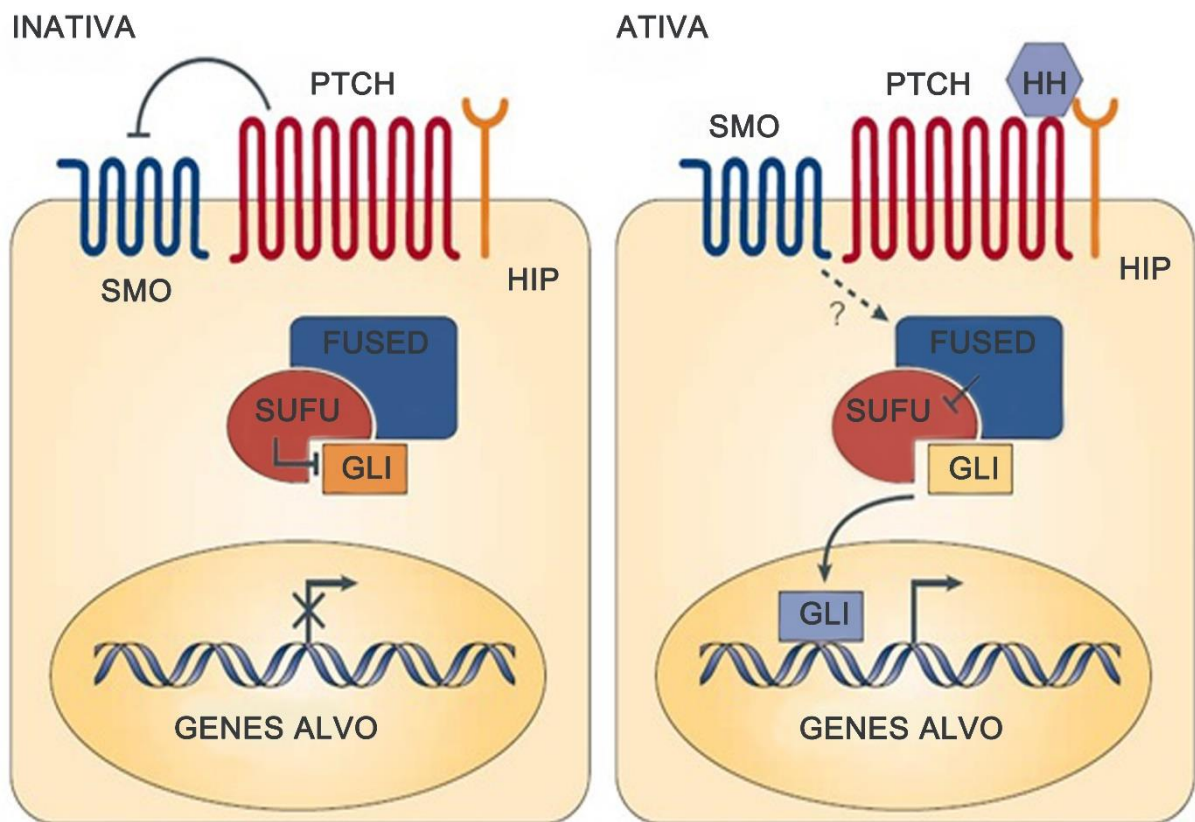
Finalmente, é importante ressaltar que a via de sinalização HH está intimamente ligada a muitas outras vias de sinalização como vias de Wnt/ beta-catenina, TGF-beta/BMP, Notch e FGF, todas elas profundamente envolvidas em processos de morfogênese do tecido e homeostase, organogênese e renovação das células-tronco em adultos (HERETSCH, TZAGKAROULAKI & GIANNIS, 2010).

### **2.2.1 O gene PTCH**

Evidências mostram que o gene Patched (PTCH ou PTCH 1) pode ser um significativo fator no desenvolvimento do KCOT não-sindrômico. Esse gene, mapeado no cromossomo 9q22.3-31, codifica a proteína Patched, uma proteína transmembrana de 12 passagens que funciona como um receptor, cujo ligante é a proteína Sonic Hedgehog (SHH). Na ausência de estimulação de SHH, Patched suprime a atividade da via através da inibição de Smoothed (SMO), com o qual se

associa (LUM & BEACHY, 2004). SMO é uma proteína transmembrana de sete passagens que, uma vez livre da inibição promovida por Patched, ativa a via de SHH, levando à transcrição de genes como GLI-1 e GLI-2, que aumentam a transcrição de genes relacionados à proliferação celular (ADOLPHE, HETHERINGTON & ELLIS et al., 2006) e o próprio Patched, sugerindo um mecanismo de auto-regulação da via (RIOBO & MANNING, 2007) (Figura 03). A via de SHH, bem como tantas outras, é ativa durante o desenvolvimento embrionário e, em situação de descontrole, atua na tumorigênese (FAN & TESSIER-LAVIGNE, 1994). Além disso, sua desregulação leva a defeitos congênitos e ao câncer propriamente dito (VILLAVICENCIO, WALTERHOUSE & IANNACCONE, 2000). Na embriogênese desempenha um papel crucial na padronização do tubo neural em desenvolvimento, regulando a polaridade do sistema nervoso central, a formação de neurônios motores, a padronização dorso-ventral dos somitos, a indução de estruturas ventrais do prosencéfalo, bem como a formação dos membros (FAN & TESSIER-LAVIGNE, 1994). A ação inibitória de Patched sobre a via de SHH, coibindo principalmente sua ação proliferativa, faz com que esse gene seja considerado um supressor de tumor (REICHART, PHILIPSEN & SCIUBBA, 2006). Mutações no gene PTCH foram identificadas como um evento genético subjacente da Síndrome do Carcinoma Nevoide Basocelular (NBCSS) (HAHN et al., 1996).

Neoplasias em pacientes com NBCSS surgem provavelmente por um mecanismo de dois “hits”, de acordo com o modelo de Knudson para genes supressores de tumor (KNUDSON, 1971), em que células precursoras contêm um primeiro “hit” hereditário e a perda alélica representa a perda do alelo normal, também conhecida como “perda de heterozigossidade” (LOH - do inglês *Loss of Heterozygosity*) (BARRETO, 2000; LEVANAT et al., 1996). BCCs e KCOTs não-sindrômicos podem surgir a partir de células suscetíveis, nas quais dois “hits” somáticos ocorreram, um dos quais se manifesta como perda alélica. Com base neste mesmo modelo, Lench et al sugeriram que quando múltiplos tumores estão presentes em pacientes com NBCCS, uma mutação de predisposição já ocorreu na linhagem germinativa, sendo necessário apenas um único evento mutacional somático para causar inativação homozigótica e progressão neoplásica. Em KCOTs não-sindrômicos, dois eventos mutacionais independentes são necessários na célula somática (LECH et al, 1996, MENDES, CARVALHO & VAN DER WALLS, 2010).



**Figura 03: Via de sinalização Hedgehog.** Na ausência do ligante, a via de sinalização HH é inativa (esquerda). Neste caso, a proteína transmembranar receptora Patched (PTCH) inibe a atividade de Smoothed (SMO), uma proteína transmembranar de sete passagens. O fator de transcrição GLI, um componente da sinalização HH abaixo da membrana, é impedido de entrar no núcleo através de interações com proteínas citoplasmáticas, incluindo Fused e Suppressor of fused (SUPFU). Como consequência, ativação da transcrição de genes alvo de HH é reprimida. A ativação da via (à direita) é iniciada através da ligação de qualquer um dos três ligantes de mamíferos - Sonic Hedgehog, Desert Hedgehog ou Indian Hedgehog (todos estão representados na figura como HH) - a PTCH. A ligação do ligante resulta em desrepressão de SMO, ativando assim uma cascata que leva à translocação da forma ativa do fator de transcrição GLI ao núcleo. GLI nuclear ativa a expressão de genes alvo, incluindo PTCH e o próprio GLI, bem como HIP, uma proteína de ligação de HH, que atenua a difusão do ligante. Outros genes alvo que são importantes para a função oncogênica da via HH são genes que estão envolvidos no controle da proliferação celular (ciclina D, ciclina E, Myc e componentes da via do fator epidérmico de crescimento) e na angiogênese (componentes da via do fator de crescimento derivado da plaqueta e da via do fator de crescimento vascular-epitelial). **Adaptado de PASCA DI MAGLIANO & HEBROK, 2003.**

Sendo assim, a LOH ocorre na região contendo o gene PTCH tanto em tumores odontogênicos ceratocísticos isolados quanto hereditários (LENCH et al., 1996; LEVANAT et al., 1996), e os subsequentes achados de mutações em PTCH em KCOTs isolados (não-sindrômicos) geraram um intenso interesse no papel deste gene em desordens odontogênicas (BARRETO et al, 2000). Assim, mutações no gene PTCH levam à perda de função da proteína de mesmo nome, tendo como consequência a falta de repressão da atividade de SMO, resultando em efeitos proliferativos. Da mesma forma, a ativação aberrante de SMO devido a mutações em SMO poderia causar a transdução de sinal ligante-dependente, levando a um crescimento neoplásico (TOFTGARD, 2000). Dado que as ativações de SMO, como a inativação de PTCH, regulam positivamente a transcrição de genes alvo da via Hedgehog (HH), não foi inesperado que a ativação de mutações no gene SMO tenham sido identificadas em BCCs e meduloblastomas (REIFENBERGER et al., 1998; XIE et al., 1998). No entanto, no estudo de Sun, Li e Li, não foi detectada mutação patogênica de SMO em um total de 50 KCOTs, dentre os quais 16 foram de pacientes com a síndrome de Gorlin. Estes resultados sugerem que a mutação em SMO é extremamente rara e que a desregulação da sinalização HH causada pela inativação de PTCH está envolvida na patogênese de KCOTs (SUN, LI & LI, 2008). Quase sempre, BCCs em indivíduos com síndrome de Gorlin são causados por mutação no gene Patched (JOHNSON et al, 1996). Esta característica é compartilhada pela maioria dos BCCs que surgem isoladamente em indivíduos sem síndrome de Gorlin, em que a mutação é resultado de injúria ambiental. Sendo assim, muitos BCCs resultam da perda de função em Patched 1, e uma minoria de BCCs resulta do ganho de função por mutações em SMO (VON HOFF et al, 2009). Em ambos os casos, SMO é ativado (TANG, 2011).

Talvez a exceção mais contestada da hipótese de dois *hits* é a haploinsuficiência (ausência ou função reduzida devido à perda ou inativação de um único alelo). Evidência para o modelo da haploinsuficiência surge a partir de estudos de ratos PTCH1 + / - (WETMORE et al, 2000; ZURAWEL et al, 2000). Ratos heterozigotos para PTCH1 recapitularam os sintomas típicos de desenvolvimento da Síndrome de Gorlin e desenvolveram meduloblastoma, o que implica que a haploinsuficiência de PTCH1 é suficiente para promover formação do tumor em ratos. Estudos *in vivo* demonstraram que várias proteínas mutantes PTCH1



poderiam resultar na ativação da sinalização HH através de um mecanismo dominante-negativo, apesar da produção de PTCH1 tipo selvagem (HIME et al., 2004). Assim, não apenas o modelo de dois *hits* padrão, mas também o modelo um *hit* exibindo haploinsuficiência ou isoformas dominante-negativas podem estar envolvidos na inativação do gene PTCH1. A incapacidade de detectar qualquer *hit* em cerca de um terço dos casos de KCOTs examinados pode ser explicado pela presença de um modelo de tumorigênese multigênico (LI, 2011).

Acredita-se que os tumores surjam a partir de uma progressão de passos múltiplos. Quanto mais avançado o tumor, mais *hits* foram acumulados. O estudo de Pan et al demonstraram que o percentual de casos dois *hits* em KCOTs síndrômicos (53,3%) foi significativamente maior do que em KCOTs não-síndrômicos (17,2 %) (PAN et al., 2010), sugerindo que mais *hits* destrutivos acumularam devido à diminuição da eficiência de reparo do DNA e/ou aumento da instabilidade genética em lesões relacionadas à síndrome. Os casos com apenas um *hit* podem representar uma fase precoce da progressão do tumor, e um segundo *hit* pode eventualmente ocorrer com um fenótipo mais grave (LI, 2011).

Todas essas transformações, ou seja, as mutações PTCH1, LOH, mecanismos dois *hits*, e assim por diante, são por definição características de um processo neoplásico. No entanto, ainda pode-se argumentar que estas anomalias detectadas não são consistentes em todos os KCOTs, mas são observados em apenas uma proporção de casos (LI, 2011).

A frequência de mutação de PTCH em pacientes síndrômicos relatada varia consideravelmente em diferentes estudos, de 40 a 80%. A taxa de novas mutações é alta (SOUFIR et al, 2006), e um total de 248 mutações foram registradas no banco de dados de mutação de PTCH durante um período de 7 anos (1999-2005) (LINDSTROM et al, 2006). Alguns estudos (GU et al, 2006; LI et al, 2008; SUN, LI & LI, 2008; PAN & LI, 2009; BARRETO et al, 2000; OHKI et al, 2004; SONG et al, 2006) revelaram que mais de 85% dos KCOTs síndrômicos e quase 30% dos KCOTs isolados abrigaram mutações em PTCH (LI, 2011). Em estudos nos quais a expressão imunohistoquímica da proteína PTCH foi examinada concomitantemente com o seu estado mutacional, esta foi expressa independentemente da presença de mutações gênicas (ZEDAN et al, 2001; BARRETO et al, 2002). Estas observações

podem ser explicadas pela teoria da haploinsuficiência, que é a perda de um único alelo PTCH, enquanto que o alelo restante é responsável pela produção da proteína identificada por imunohistoquímica (ZEDAN et al, 2001; OHKI et al, 2004). Outra explicação possível poderia ser que a mutação em PTCH leva à produção de uma proteína aberrante, não funcional, que acumula a uma quantidade necessária para a detecção imunohistoquímica, num padrão que lembra a da proteína p53 (associada à proliferação no tecido neoplásico) (ZEDAN et al, 2001; VERED et al, 2009).

Zedan et al realizaram análise imunohistoquímica e mutacional de BCCs e KCOTs isolados e síndrômicos e encontraram diferentes padrões de expressão de PTCH observados na camada epitelial de células basais de KCOTs associados à NBCCS e isolados. Em KCOTs síndrômicos, a marcação mais forte foi observada em células da camada basal em paliçada. Em contraste, tal expressão esteve ausente na camada de células basais de KCOTs isolados. Mutações foram detectadas tanto em tumores isolados quanto síndrômicos, mas o tipo de mutação de PTCH (linhagem germinativa ou somática) e a fase em que a mutação ocorre (embrionária ou após o nascimento) é fundamental para determinar o resultado do quadro fenotípico. Os autores afirmam que este último ponto pode ter relevância para explicar as diferenças entre pacientes síndrômicos e os não-síndrômicos. Se a expressão da proteína localiza-se na camada basal (síndrômica), isto pode representar uma capacidade proliferativa epitelial não encontrada em casos isolados, onde a expressão nas camadas mais superficiais pode representar um fenótipo mais diferenciado (ZEDAN et al, 2001). Sendo assim, o epitélio odontogênico síndrômico tem a capacidade de crescer mais rápido, “brotar” para formar novos “cistos-satélite”, e até mesmo a crescer novamente (lesão recorrente) após a remoção incompleta do cisto (BRANNON, 1977).

Em um estudo de Li et al foi detectada a expressão de SHH, proteínas PTCH1 e GLI1 em carcinoma de vesícula biliar (GBC - do inglês *Gallbladder Carcinoma*) primário por imuno-histoquímica. Os resultados mostraram que taxas positivas da expressão de proteínas SHH, PTCH1 e GLI1 foram significativamente mais elevadas em tecidos do GBC do que em tecidos de vesícula normais. Os autores também encontraram uma correlação positiva entre a expressão de componentes da via HH e características clínico-patológicas do tumor (LI et al, 2012). Neste estudo, a correlação de SHH, PTCH1, superexpressão de GLI1 e

baixa sobrevida podem ser explicados pela proliferação de células, migração, invasão e efeito promotor da angiogênese e o efeito de inibição de apoptose da ativação da via de HH (MORTON et al, 2010). Baseados nestes resultados, os autores sugerem que a via pode desempenhar um papel importante no prognóstico de pacientes com GBC e que a identificação de pacientes de alto risco com base na expressão de componentes da via HH irá melhorar as estratégias de tratamento com melhores resultados para o paciente (LI et al, 2012).

Recentemente mutações do gene SUFU (do inglês - *Suppressor of Fused*), que codifica um componente da via SHH têm sido identificadas como uma alteração genética secundária que pode ocorrer em pacientes com NBCCS e meduloblastomas (REGEZI, SCIUBBA & JORDAN, 2008).

### 2.2.2 Componentes da via HH

Mamíferos têm três tipos diferentes de proteínas HH, Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) e Desert Hedgehog (DHH), dois receptores Patched , PTCH1 e PTCH2 e três proteínas *ci-like* (semelhantes à cinesina), GLI1, GLI2 e GLI3 (BAI & JOYNER, 2001; VARJOSALO & TAIPALE, 2008). Sonic Hedgehog é mais amplamente expressa e, como resultado, SHH é o foco da pesquisa e desenvolvimento de medicamentos (VARJOSALO & TAIPALE, 2008). Além disso, os mamíferos têm uma proteína interativa Hedgehog (HIP - do inglês *Hedgehog interacting protein*), não encontrada em *Drosophila*, que parece funcionar como um regulador de disponibilidade do ligante. Esta glicoproteína ligada à membrana foi descoberta em camundongos e se liga a todas as três proteínas Hedgehog, atenuando a resposta celular aos estímulos mediados por SHH (CHUANG & MCMAHON, 1999). HIP tem uma afinidade de ligação para SHH comparável à de PTCH, sugerindo a existência de um mecanismo de feedback negativo adicional para regulação de respostas da sinalização SHH (DAYA-GROSJEAN & COUVE´-PRIVAT, 2005).

SHH é uma proteína de 20 kD de tamanho, hidrofóbica, com ácidos graxos adicionados a sua extremidade N-terminal e colesterol adicionado à extremidade C-terminal (SCALES & DE SAUVAGE, 2009).

Patched, o componente que se liga especificamente a Hedgehog, é uma glicoproteína de 1500 aminoácidos abrangendo 12 domínios de membrana (HOOPER & SCOTT, 1989) e dois grandes laços (*loops*) extracelulares, que são necessários para a ligação de hedgehog (BALE & YU, 2001). Existem vários homólogos de Patched em humanos. Patched 1 (PTCH 1) é, provavelmente, o principal receptor molecular para todas as três formas de Hedgehog humano e mutações neste gene estão associadas com uma grande variedade de malformações congênitas (HAHN et al., 1996, GOODRICH et al, 1997).

Patched 1 reprime a atividade de um receptor chamado Smoothened, que normalmente ativa uma família de fatores de transcrição, denominados fatores de transcrição associados ao glioma (GLI1, GLI2 e GLI3). Estes três fatores de transcrição controlam a expressão de Patched 1 (que fornece um feedback negativo da sinalização de Hedgehog) e do próprio GLI1 (que proporciona um feedback positivo da sinalização Hedgehog) (CHUANG & MCMAHON, 1999). Este último entra no núcleo e ativa a transcrição de genes que estão relacionados com a proliferação celular e genes do ciclo celular (por exemplo, ciclina D1, WNT e TGF- $\beta$ , relacionados às vias de sinalização) (HIGH & ZEDAN, 2005; BALE & YU, 2001; LEVANAT et al, 1996). Desse modo, GLI1, se comporta essencialmente como um ativador de transcrição, enquanto GLI2 e GLI3 tem tanto funções ativadoras como repressoras (RUIZ I ALTABA, SÁNCHEZ & DAHMANE, 2002; RUIZ, 1999; INGHAM & MCMAHON, 2001).

Smoothened localiza-se no braço longo do cromossomo 7 (*locus* 7q31-q32) e codifica uma proteína transmembranar de sete passagens estruturalmente semelhante à família de receptores acoplados à proteína-G (GPCR- do inglês *G-protein coupled receptor*), é o transdutor de sinalização intracelular SHH (DAYA-GROSJEAN & COUVE´-PRIVAT, 2005).

PTCH2 foi identificado e localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p32.1-32.3) (ZAPHIROPOULOS et al, 1999). Este gene codifica uma proteína transmembranar de 1203 aminoácidos, a qual tem uma elevada homologia com a proteína PTCH1 (SMYTH et al., 1999) (é 57% idêntica a PTCH1). Ele diverge principalmente na região hidrofílica entre domínios transmembrana 6 e 7. Além disso, PTCH2 carece da extensão C terminal presente em PTCH1 de camundongo,

galinha e humano (GOODRICH et al, 1996; MARIGO et al, 1996). Semelhante a PTCH1, PTCH2 é um receptor para SHH, e está envolvido na sinalização celular SHH / PTCH (CARPENTER et al., 1998).

Carpenter et al verificaram que PTCH2 é preferencialmente expresso na pele e nos testículos. A análise de ligação indica que ambos PTCH1 e PTCH2 podem interagir com todos os membros da família HH com uma afinidade semelhante e formar um complexo com SMO (CARPENTER et al, 1998), sendo que, a supressão do desenvolvimento do folículo piloso inibe a indução de SHH, PTCH1 e PTCH2 em primórdios embrionários de cabelo em camundongos (YAMAGO et al, 2001). Mutações em PTCH2 são eventos muito raros em meduloblastomas e BCCs (SMYTH et al, 1999). Além disso, o fato de que PTCH1 mutado em BCCs não poder ser substituído pela superexpressão de PTCH2 indica que este gene é semelhante, porém exerce funções distintas quando comparado com PTCH1 (ZAPHIROPOULOS et al, 1999). O que pode explicar a incapacidade de PTCH2 de substituir a função de PTCH1 mutado ou deletado em tumores resultantes da ruptura desta via seriam as diferenças na capacidade de influenciar a sinalização HH destes dois tipos de receptores. Portanto PTCH2 pode ter um papel mais restrito quando comparado com PTCH1, não excluindo a possibilidade de que poderia PTCH2 se acoplar à HH, sinalizando para efetores da via ainda desconhecidos (RAHNAMA, TOFTGARD & ZAPHIROPOULOS, 2004).

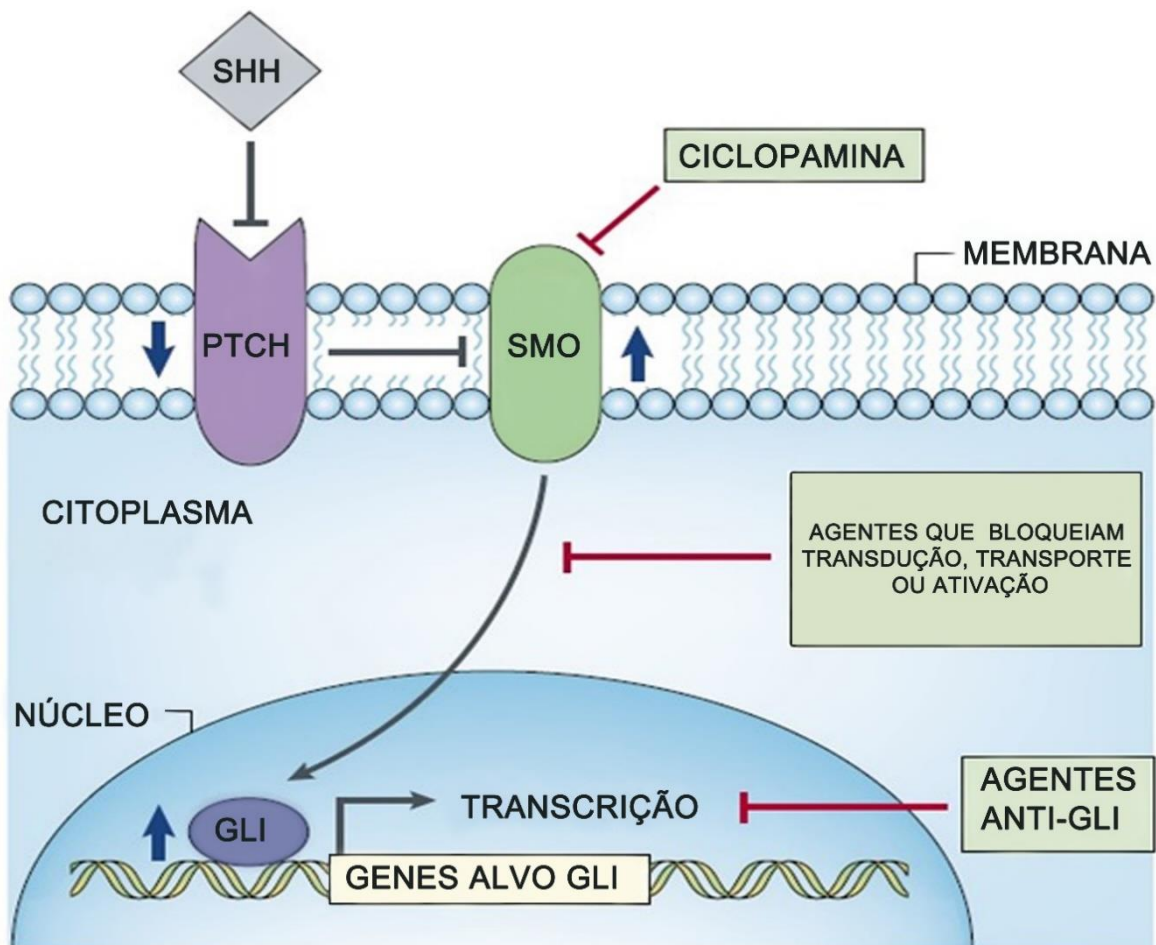
### **2.2.3 Inibidores da via HH**

Estudos relacionados com a via de HH forneceram percepções sobre o desenvolvimento de abordagens terapêuticas moleculares para a síndrome de Gorlin e tumores relacionados, incluindo KCOTs. A via de HH pode ser bloqueada em diferentes níveis, e inibidores HH poderiam servir como agentes anti-tumorais devido aos seus efeitos específicos sobre um número reduzido de tecidos adultos (PASCA DI MAGLIANO & HEBROK, 2003). Ao contrário, estimuladores da via de HH poderiam encontrar aplicações como indutores da angiogênese (GOODRICH et al, 1996) e ativar a via de sinalização HH, ou seja, eles têm uma influência direta sobre a transcrição de genes de resposta HH (HERETSCH, TZAGKAROULAKI & GIANNIS, 2010).

Chen e Beachy descobriram o primeiro inibidor de Smoothened, a Ciclopamina, um alcaloide esteroide derivado da planta lírio milho Califórnia (TANG, 2011). Chen e colaboradores (CHEN et al, 2002) descobriram que a ciclopamina se liga à Smoothened e bloqueia a ativação de genes alvo da via (TANG, 2011) (Figura 04).

A ciclopamina foi descoberta quando encontraram fetos de ovelhas que apresentavam malformações comparáveis às encontradas na holoprosencefalia porque estas ovelhas prenhas haviam ingerido plantas contendo este inibidor de SMO (TAIPALE et al, 2000; COOPER et al, 1998; INCARDONA et al, 1998). A descoberta de pequenas moléculas antagonistas da sinalização SHH abriu novas perspectivas para a terapia de BCCs (TAIPALE et al, 2000; CHEN et al, 2002; WILLIAMS et al, 2003; FRANK-KAMENETSKY et al, 2002), o que levou à busca de pequenas moléculas inibidoras sintéticas da sinalização hedgehog e validação de seus efeitos (DAYA-GROSJEAN & COUVE´-PRIVAT, 2005).

O tratamento com ciclopamina em ratos que carregavam tumores HH-dependentes resultou na inibição do crescimento e regressão do tecido canceroso, mas não afetou a saúde dos animais tratados (LI, 2011). Juntamente com a constatação de que ovelhas adultas não sofrem efeitos nocivos da ciclopamina, estes resultados apoiam a possibilidade deste agente ser utilizado no tratamento de BCCs e qualquer outro tipo de tumor associado com mutações em Patched ou SMO (BALE & YU, 2001). Portanto, a inibição de HH provoca poucos, se alguns, efeitos tóxicos em células que não dependem da sinalização de HH (BERMAN et al., 2002; THAYER et al, 2003).



**Figura 04: A via SHH-GLI e locais potenciais para bloqueá-la com agentes terapêuticos.** Sonic hegehog (SHH) atua sobre o complexo receptor de membrana formado por Patched (PTCH) e Smoothened (SMO) para inibir a repressão de SMO por PTCH. SMO envia o sinal intracelular através de várias etapas de transdução citoplasmáticas (não mostradas), que conduzem à ação nuclear das proteínas GLI, que regulam os genes-alvo. Setas azuis grossas apontando para cima ou para baixo indicam ativação ou inativação de mutações, respectivamente, que podem induzir a via. Os inibidores da via com um valor terapêutico potencial (linhas vermelhas) incluem: agentes que bloqueiam a ação de SMO no complexo receptor, tal como o alcaloide da planta ciclopamina; agentes que inibem aspectos específicos da transdução do sinal, incluindo a importação nuclear ou ativação de proteínas GLI; e agentes que inibem especificamente a função de GLI. **Adaptado de RUIZ I ALTABÁ, SÁNCHEZ & DAHMANE, 2002)**

Uma outra abordagem, a imunoprevenção dos BCCs com HIP (do inglês *Hedgehog Interacting Protein*) recombinante, demonstrou ser muito promissora como um tratamento preventivo para pacientes NBCCS destinados a desenvolver BCCs (VOGT et al, 2004). Assim, estes autores sugerem que os genes consistentemente superexpressos em BCCs pela sinalização hedgehog aberrante podem ter grande potencial como alvos da imunização para a eliminação efetiva de tumores em pacientes predispostos ao aparecimento de BCCs (DAYA-GROSJEAN & COUVE'-PRIVAT, 2005).

O uso de moléculas inibidoras para receptores alvo é mais comum do que o uso de inibidores de ligantes, porém neste contexto há o Robotnikin, que é uma pequena molécula que se liga a SHH, inibindo a sinalização HH (GOULD & MISSAILIDIS, 2011). Robotnikin inibiu sinalização Hedgehog somente na ausência de agonistas SMO, confirmando que opera a um nível acima desta proteína (STANTON et al, 2009). Além disso, GLI também pode ser inibida ao nível do RNA, ligando os seus transcritos com oligonucleótidos anti-sense - uma abordagem que tem sido utilizada com sucesso em *Xenopus* (PASCA DI MAGLIANO & HEBROK, 2003). Os compostos mais promissores são GANT58 e GANT61, que foram descobertos num *screening* celular por inibição da transcrição de GLI1 (é o fator de transcrição mais fortemente implicado no câncer) (LAUTH et al, 2007).

Uma pequena molécula (Cur61414) foi identificada por bloquear elevada atividade de sinalização HH resultante de mutações oncogênicas em PTCH1. Esta molécula pequena pode suprimir a proliferação e induzir a apoptose de ninhos basalóides no carcinoma basocelular em sistemas modelo, mas não tem nenhum efeito sobre as células normais da pele (WILLIAMS et al., 2003). Mais recentemente, uma pequena molécula oralmente ativa, que atinge a via HH, GDC-0449, também foi relatada por mostrar a atividade anti-tumoral em carcinoma de células basais localmente avançado ou metastático em um ensaio clínico de fase 1 (VON HOFF et al., 2009). Zhang et al postularam que os antagonistas de fatores de sinalização HH poderiam tratar eficazmente KCOTs. Suas estratégias sugeridas incluem re-introdução de uma forma tipo selvagem de PTCH1, inibindo a molécula SMO por antagonistas sintéticos e suprimindo os fatores de transcrição abaixo da membrana da via de HH. Eles sugerem que a injeção intracística de uma proteína antagonista de SMO pode ser a opção de tratamento mais promissora (ZHANG et al, 2006).

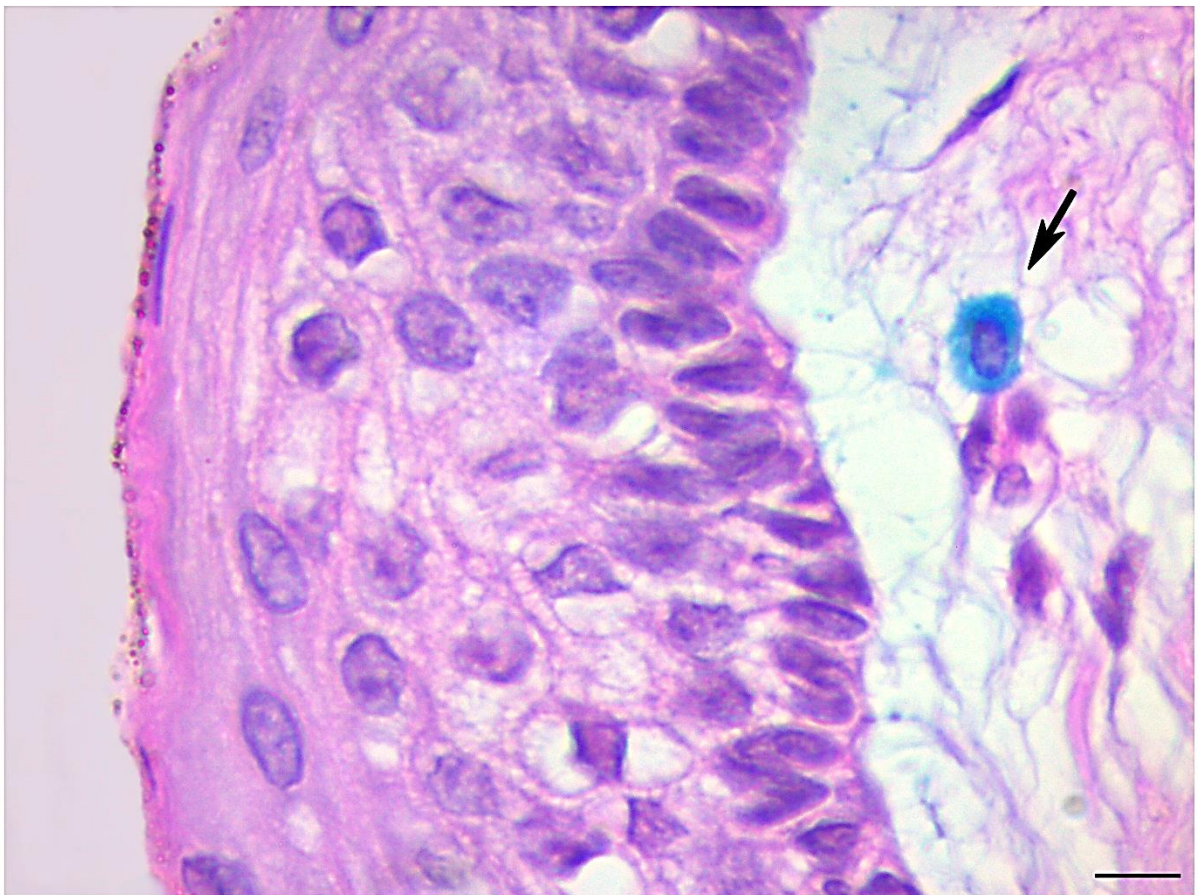


Por fim, estes resultados demonstram diretamente que o uso de inibidores de Hedgehog poderá ser uma abordagem terapêutica válida para o tratamento de BCCs, e também de KCOTs (WILLIAMS et al., 2003). Dessa forma, o estudo do envolvimento dessa via de sinalização em KCOTs é importante para compreender os mecanismos pelos quais os elementos dessa via atuam na patogênese desses tumores.

### **2.3 Mastócitos**

Outro dado que vem sendo investigado no que tange ao aspecto diferencial de KCOTs sindrômicos e isolados é a presença de mastócitos (MCs - do inglês *Mast Cells*). A função dessas células no desenvolvimento tumoral tem sido amplamente revista, com sugestões variadas de que elas podem modificar o equilíbrio a favor ou contra o crescimento do tumor (MALTBY, KHAZAIE & MCNAGNY, 2010). Os mastócitos figuram entre as células mais numerosas no estroma de tumores odontogênicos de uma maneira geral e, com relação a sua presença nos KCOTs, demonstrou-se que os mastócitos figuram em maior número nas lesões relacionadas a um componente sindrômico do que naquelas isoladas (PEREIRA et al, 2011). Trata-se de uma célula de infiltração precoce e persistente em vários tumores, a níveis detectáveis muitas vezes antes que um significativo crescimento e angiogênese do tumor tenham ocorrido (MALTBY, KHAZAIE & MCNAGNY, 2010). Produtos dos mastócitos tais como histamina, fator de crescimento fibroblástico básico e heparina têm sido apontados como elementos envolvidos na promoção da angiogênese do tumor (KALRA et al., 2012). A angiogênese, isto é, a formação de novos vasos a partir daqueles pré-existentes - como capilares e vênulas pós-capilares, desempenha um papel essencial durante o desenvolvimento embrionário (RIBATTI, 2006). Posteriormente, na vida adulta, esta ocorre em várias condições fisiológicas (por exemplo, formação do corpo lúteo) e patológicas, tais como em tumor e inflamação crônica, onde ela pode contribuir para a progressão da doença (RIBATTI & CRIVELLATO, 2012).

O mastócito maduro é uma célula globosa, grande e com citoplasma repleto de grânulos que se coram intensamente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008) (Figura 05).



**Figura 05: Mastócito (seta) identificado no KCOT.** Apresenta-se como uma célula grande e globosa. Notar grânulos citoplasmáticos corados em azul e núcleo central basofílico. Coloração com Alcian Blue. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer. Barra de escala: 20  $\mu$ m

Seu diâmetro varia entre 8 e 20  $\mu\text{m}$  e são facilmente reconhecidos por microscopia de luz (DVORAK, 2005). O núcleo é pequeno, esférico e central e de difícil observação por estar frequentemente encoberto pelos grânulos citoplasmáticos que são elétron-densos, heterogêneos e contêm mediadores químicos como a histamina e glicosaminoglicanas. Além disso, seus grânulos são metacromáticos (apresentam a propriedade de metacromasia, na qual moléculas mudam a cor de alguns corantes básicos, por exemplo, azul de toluidina) devido à alta concentração de radicais ácidos presentes nos glicosaminoglicanos (heparina e condroitin sulfatado). Os mastócitos se originam de células precursoras hematopoiéticas situadas na medula óssea. Quando imaturos, circulam no sangue, cruzam a parede de vênulas e capilares e penetram nos tecidos, onde vão proliferar e se diferenciar (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Estas células povoam as estruturas do tecido conjuntivo próximas de vasos e nervos (WELLER et al, 2006; GRIMBALDESTON et al, 2007) e também foram encontradas no sistema nervoso central de várias espécies de vertebrados, onde eles exercem funções ainda não totalmente esclarecidas (SILVER et al, 1996). Por outro lado, mastócitos não estão presentes em tecidos como o osso mineralizado, cartilagem, e córnea (RIBATTI & CRIVELLATO, 2012).

Mastócitos têm sido implicados nas clássicas doenças alérgicas IgE-associadas, tais como urticária, conjuntivite sazonal, rinite alérgica e asma. No entanto, eles são considerados protagonistas cruciais na defesa do hospedeiro, apresentando resposta de primeira linha para diferentes produtos químicos e injúrias biológicas no contexto da resposta imunitária adquirida ou inata. Além disso, a evidência crescente indica que mastócitos podem ter envolvimento distinto em funções não-imunológicas tais como a angiogênese, cura de ferida, remodelação tecidual e fibrose, desempenhando assim um papel na homeostase do tecido. Deste modo, MCs podem ser ativados tanto através de vias IgE-dependentes quanto IgE-independentes (CRIVELLATO, NICO & RIBATTI, 2009).

Estas células são convencionalmente divididas em dois tipos, dependendo da expressão de diferentes proteases em seus grânulos e outras características funcionais (IRANI et al, 1986). MCs que contêm apenas triptase são designados como MC<sub>T</sub> ou MCs "células-imunes associados". Eles são predominantemente localizados na mucosa respiratória e intestinal, onde eles se co-localizam em torno

de linfócitos T. MCs que contêm triptase e quimase, juntamente com outras proteases, tais como a carboxipeptidase A e catepsina G, são referidos como MC<sub>TC</sub>. Eles se encontram predominantemente em áreas do tecido conjuntivo, como a pele, submucosa do estômago e do intestino, parênquima mamário, miocárdio, linfonodos, conjuntiva e membrana sinovial. Estes dois subconjuntos de MCs humanos diferem também em termos de seu conteúdo mediador e reatividade. Um terceiro tipo de mastócito, chamado MC<sub>C</sub>, foi identificado. Esta célula expressa quimase sem triptase e reside principalmente na submucosa e mucosa do estômago, submucosa de intestino delgado e mucosa do cólon (RIBATTI & CRIVELLATO, 2012).

Uma associação entre MCs e formação de novos vasos foi avaliada no câncer de mama (BOWREY et al, 2000). Em lesões mamárias malignas, o número de MCs com atividade de triptase mostrou ser significativamente maior do que em lesões benignas. MCs estavam concentrados no limite do tumor, a assim chamada "Zona de invasão" (KANKKUNE, HARVIMA & NAUKKARINEN, 1997). Uma associação entre MCs e angiogênese também foi relatada em carcinoma colorretal. O aumento do acúmulo de MCs azul de toluidina ou triptase-positivos infiltrando o carcinoma colorretal mostrou correlação com o aumento da densidade de microvasos e prognóstico menos favorável (ACIKALIN et al, 2005; GULUBOVA & VLAYKOVA, 2009). Pacientes com baixa densidade de MCs e tecidos tumorais hipovasculares tiveram sobrevida significativamente maior do que aqueles com elevada densidade de MCs e biópsias de tumores hipervasculares (CRIVELLATO, NICO & RIBATTI, 2009).

Teronen et al afirmaram que mastócitos ativados podem sintetizar mediadores vasoativos e quimiotáticos (por exemplo, fator ativador de plaquetas) bem como citocinas pró-inflamatórias tais como Interleucinas 3 e 6 (IL-3 e IL-6) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$  - do inglês *Tumor Necrosis Factor*). Estes mediadores químicos aumentam a permeabilidade vascular assim facilitando o influxo de substâncias altamente osmolares no lúmen cístico. A maior concentração de mastócitos em KCOTs explica uma maior expansão quando comparada com outros cistos odontogênicos. Os autores também encontraram um alto número de extensiva degranulação de mastócitos em áreas de expansão cística na borda com parede óssea sugerindo alta atividade de mastócitos nesta área (TEROTEN et al, 1995; CHATTERJEE et al., 2008). Além disso, degranulação de mastócitos também libera

triptase e prostaglandinas, que ajudam na reabsorção óssea, que é uma característica no alargamento do cisto na interface cisto-osso. Além disso, a interleucina-1 $\alpha$  na parede de KCOTs mostrou ter um efeito potenciador sobre as metaloproteinases da matriz secretadas por fibroblastos (KUBOTA et al, 2002).

Os mastócitos podem liberar numerosas moléculas pró-inflamatórias, imunorreguladoras e angiogênicas através de diferentes vias de estimulação (CRIVELLATO & RIBATTI, 2005). A ativação dos mastócitos provou ter muitas consequências biológicas, tais como a mitogênese, degradação da matriz extracelular, angiogênese, aumento de hiperpermeabilidade microvascular (CRIVELLATO et al, 2004) e recrutamento de células inflamatórias incluindo macrófagos. Sabe-se que a neoangiogênese é necessária para o crescimento e disseminação de tumores (MICHAILIDOU, MARKOPOULOS & ANTONIADES, 2008).

Dessa forma, a identificação de mastócitos nas lesões e a sua correlação com o grau de agressividade das mesmas pode contribuir para um maior conhecimento acerca do papel que estas células desempenham no crescimento e desenvolvimento do tumor isolado e associado à NBCCS.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo Geral

Realizar uma análise comparativa entre os Tumores Odontogênicos Ceratocísticos síndrômicos e não-síndrômicos registrados no Serviço de Anatomia Patológica (SAP) da UFES, verificando o padrão de expressão da proteína Patched e a distribuição de mastócitos em cada um deles.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Analisar os laudos histopatológicos do SAP para levantamento dos casos de Tumor Odontogênico Ceratocístico (KCOT) e coleta de dados clinicopatológicos;
2. Avaliar as características histopatológicas dos KCOTs corados em Hematoxilina e Eosina (HE);
3. Quantificar a presença de mastócitos nos KCOTs corados com Alcian Blue;
4. Detectar e quantificar a expressão da proteína Patched nos KCOTs através de ensaios imunohistoquímicos e morfométricos;
5. Correlacionar os achados histopatológicos e imunohistoquímicos com os dados clinicopatológicos obtidos dos tumores investigados.

### 4 Material e Métodos

A pesquisa em questão é um estudo retrospectivo de uma série de casos. As amostras foram obtidas através de uma seleção dos casos de pacientes diagnosticados com KCOT durante o período de março de 2004 a dezembro de 2012. Para isso, os laudos histopatológicos pertencentes ao arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Curso de Odontologia da UFES foram analisados e informações pertinentes aos pacientes e às lesões foram coletadas (Ficha de coleta no APÊNDICE A). Os critérios de inclusão foram:

- a) Acesso ao laudo histopatológico do paciente, onde constavam dados relativos à etnia, idade e gênero e informações como número de lesões, tipo de lesão, localização da lesão e ocorrência de recidiva;
- b) Material suficiente nos blocos de parafina para confecção de novas lâminas para análise imuno-histoquímica.

#### **4.1 Obtenção das amostras:**

Os blocos de parafina retirados do arquivo do SAP-UFES foram obtidos segundo o protocolo de preparação dos tecidos adotado pelo Programa de Prevenção e Diagnóstico Precoce do Câncer de Boca e Lesões Bucais, que determina a fixação dos espécimes em uma solução tamponada de formol 10%, seguido de processamento histológico até a inclusão em parafina.

Os blocos com os casos de KCOTs selecionados foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes seriados com 4 µm a 5 µm de espessura, para a técnica de coloração com Alcian Blue e para a imuno-histoquímica, utilizando-se micrótomo manual (Leica RM 212 RT, Leica Biosystems Nussioch GmbH, Alemanha). Imediatamente após a microtomia, os cortes passaram por uma solução de álcool 30% com a finalidade de esticá-los, depois foram imersos em banho-maria a 45°C (Lupetec BH 05) e pescados com lâminas não silanizadas (utilizadas para coloração com Alcian Blue, as quais foram previamente limpas com álcool 70%) e silanizadas (utilizadas para a técnica imuno-histoquímica, estas não devem ser limpas com solução alcoólica), e devidamente identificadas. As lâminas foram mantidas em estufa (FANEM 900 kW, modelo 310, Brasil) por 24 horas, a 40°C para secagem. O processamento das lâminas foi realizado no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Tumorigênese do Departamento de Morfologia/UFES.

#### **4.2 Coloração com Hematoxilina e Eosina**

As lâminas já coradas com Hematoxilina e Eosina foram obtidas do SAP da UFES e processadas de acordo com o protocolo deste serviço. Estas lâminas, obtidas após a microtomia, foram desparafinizadas em estufa a 60°C por 40

minutos, colocadas em berços apropriados e passaram pela sequência de soluções descritas no protocolo da Hematoxilina e Eosina (HE) adotado pelo Grupo de Estudos em Patologia Bucal da UFES, descrito a seguir:

- Desparafinização em Xilol Puro (3 banhos de 3 minutos cada um);
- Imersão em solução de Álcool/Xilol (proporção 1:1, durante 3 minutos);
- Hidratação em banhos com concentração decrescente de álcool: álcool absoluto (2 banhos de 3 minutos cada um) e álcool 96% (3 minutos);
- Lavagem em água corrente por 3 minutos;
- Imersão por 6 minutos em Hematoxilina de Harris (previamente filtrada) seguida de lavagem rápida em água e logo após, mergulho rápido em álcool ácido (1% de HCl e 99% de etanol);
- Enxague em água corrente por 10 minutos e imersão em Eosina por 3 minutos;
- Lavagem rápida para retirada do excesso de corante;
- Desidratação das lâminas em álcool: álcool 96% (1 minuto) e álcool absoluto (2 banhos de 2 minutos cada);
- 1 banho de Álcool/Xilol (proporção 1:1) de 2 minutos;
- 3 banhos de Xilol puro, com imersão de 2 minutos cada.
- Montagem das lâminas em meio de montagem Permount (Fisher Scientific). Os excessos deste foram removidos e as lâminas foram etiquetadas e guardadas para secagem completa.

#### **4.3 Coloração com Alcian Blue**

Após a desparafinização em estufa a 60°C por 40 minutos, as lâminas foram colocadas em berços apropriados e passaram pela sequência de soluções descritas:

- Xilo II puro (5 minutos);
- Xilol I puro (5 minutos);
- Álcool/Xilol (proporção 1:1, durante 5 minutos);
- Álcool absoluto II (5 minutos);
- Álcool absoluto I (5 minutos);



- Álcool 90% (5 minutos);
- Álcool 80% (5 minutos);
- Enxague em água corrente (5 minutos);
- Coloração com Alcian Blue (a 1%, pH=0.5, durante 1 hora);
- Lavagem das lâminas em água destilada acidificada (15 mL de HCl em 485 mL de água destilada por 30 segundos);
- Lavagem com água destilada (remoção após 10 minutos);
- Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer (as gotas de corante devem cobrir o corte - remoção após 30 segundos);
- Lavagem rápida em água destilada;
- Álcool 95% (1 minuto);
- Álcool/Xilol (proporção 1:1, 30 segundos);
- Xilol I (30 segundos);
- Xilol II (30 segundos);
- Montagem das lâminas em meio de montagem Permount (Fisher Scientific).

#### **4.4 Técnica Imuno-histoquímica (IHQ)**

Para a análise imuno-histoquímica, os cortes entre 4 µm e 5 µm de espessura foram montados em lâminas silanizadas (Starfrost, Knittel, Biogen). Os cortes foram desparafinizados em estufa a 60°C por 40 minutos, e diafanizados em três banhos de xilol:

- Xilol II (por 5 minutos);
- Xilol I (por 5 minutos);
- Álcool/Xilol (proporção 1:1, por 5 minutos).

Em seguida foram reidratados em concentrações decrescentes de etanol:

- Álcool 100% (por 5 minutos);
- Álcool 90% (por 5 minutos);
- Álcool 80% (por 5 minutos).

Em seguida, a remoção do pigmento formólico foi feita com a seguinte solução (por 10 minutos):

- Hidróxido de amônio (10%, 10mL);
- Etanol (95%, 90mL);
- Água destilada (5mL).

Depois os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos e passaram por enxague imediato em água destilada por 2 vezes. Para neutralizar a peroxidase endógena, foi utilizado o *Peroxidase Block* por 20 minutos, sendo esta etapa realizada na câmara úmida e no escuro. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato - do inglês *Phosphate Buffered Saline*) (1X) gelado, por 3 vezes (5 minutos cada banho).

Após esta etapa, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica, utilizando-se uma solução tampão citrato (1,92g de ácido cítrico (com concentração de 10mM) para 1L de água destilada) e 0,5 mL de Tween 20 (0,05%) (acrescentado ao tampão citrato minutos antes da recuperação antigênica), sendo esta solução (com pH 6), juntamente com os cortes, aquecida em banho-maria entre 90° e 95°C, por 40 minutos.

Após a recuperação antigênica, os cortes foram lavados novamente em PBS (1X) gelado, por 2 vezes (5 minutos cada banho). Depois, os cortes foram incubados com BSA a 1% (Albumina Sérica Bovina - do inglês *Bovine Serum Albumin*) (Protein Block) por 60 minutos em temperatura ambiente.

O anticorpo primário utilizado foi o anti-Patched (Abcam®) policlonal de coelho, diluído em PBS (1X), utilizado na concentração de 1:500, por cerca de 15 h à 4°C. Os cortes foram novamente lavados em PBS (1X) 3 vezes por 5 minutos e incubados com o reagente (*Reveal Complement*) por 10 minutos, em temperatura ambiente (20-25°C).

Depois, foram adicionadas algumas gotas do Reagente Conjugado HRP (Peroxidase de Rábano - do inglês *Horseradish peroxidase*) (*Reveal HRP Conjugate*) por 15 minutos, em temperatura ambiente (20-25°C).

Após estes procedimentos, os cortes foram novamente lavados em PBS (1X) 4 vezes por 5 minutos.

Foram adicionados 10µL de DAB Cromógeno 50X (cromógeno Diaminobenzina 3,3 - do inglês 3,3'- *Diaminobenzidinetetrahydrochloride*) a 500 µL de DAB Substrato (Tampão Substrato, pH=7,5; com Peróxido de Hidrogênio) para desenvolver a atividade da peroxidase, até a reação (IHQ) ser revelada através de coloração amarronzada.

Após estes procedimentos, os cortes foram novamente lavados em PBS (1X) 4 vezes por 5 minutos.

Em seguida, as lâminas foram contrastadas com Hematoxilina de Mayer e enxaguadas em água destilada com algumas gotas de hidróxido de amônio. Procedeu-se um novo enxágue das lâminas em água corrente durante 10 minutos, seguida de desidratação em soluções alcoólicas:

- Álcool (70%) (5minutos);
- Álcool (85%) (5minutos);
- Álcool (90%) (5minutos);
- Álcool absoluto I (5minutos);
- Álcool absoluto II (5minutos);

E banhos em xilol puro:

- Xilol I (5 minutos);
- Xilol II (5 minutos).

Em seguida foi feita a montagem das lâminas com meio de montagem Permout (Fisher Scientific). O controle negativo foi feito pela omissão do anticorpo primário. O controle positivo foi feito com uma lâmina de germe dentário.

#### **4.5 Metodologia de Análise de Dados**

Os dados gerais dos pacientes (referentes à etnia, idade e gênero) e clinicopatológicos (referentes ao número de lesões, tipo de lesão, localização da

lesão e ocorrência de recidiva), coletados a partir dos laudos, foram registrados em tabelas no Excel.

#### **4.5.1 Análise das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina**

A análise histopatológica das lâminas coradas por HE foi realizada por um único examinador, previamente calibrado por um experiente morfolologista. O índice Kappa intra-examinador obtido foi de 0.85. As lâminas foram previamente cegas para que não houvesse interferência na análise dos dados e examinadas em microscópio óptico (Olympus AX70, Olympus America Inc., NY, USA), utilizando-se o aumento de 10X (para detecção da presença de parede fibrosa fina) e aumento de 40X (para detecção das demais características histopatológicas), contidas na ficha de coleta (APÊNDICE B). Os cortes foram varridos até que se encontrassem todas as características presentes na ficha de coleta. Em caso de ausência de alguma característica, todo o corte era varrido para a confirmação desta ausência no caso analisado.

#### **4.5.2 Análise das lâminas coradas com Alcian Blue**

A análise histológica das lâminas coradas por Alcian Blue também foi realizada por um examinador previamente calibrado por um experiente morfolologista.

Para a quantificação de mastócitos, foram escolhidos para cada caso até vinte campos aleatórios (o que variou para menos conforme o tamanho do corte), sendo as imagens capturadas com a câmera AxioCam ERc5s (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha) e o programa AxioVision Release 4.8.2 (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha) e salvas no formato TIF para posterior análise. As imagens dos campos foram feitas no aumento de 100X, e o número total de mastócitos foi obtido somando-se os mastócitos encontrados em cada campo, este número foi dividido pelo número de campos analisados, obtendo-se assim a média de mastócitos por campo em cada lesão. Estes valores foram agrupados e assim obteve-se média de mastócitos por campo para KCOTs síndrômicos e não-síndrômicos (Ficha de coleta no APÊNDICE C).

### **4.5.3 Análise das lâminas submetidas à Imuno-histoquímica**

A análise das lâminas submetidas à imuno-histoquímica também foi realizada por um examinador previamente calibrado por um experiente morfolologista. As lâminas foram previamente cegas e foram escolhidos para cada caso até vinte campos aleatórios (o que variou para menos conforme o tamanho do corte), sendo as imagens capturadas com a câmera AxioCam ERc5s (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha) e o programa AxioVision Release 4.8.2 (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha) e salvas no formato TIF para posterior análise. As áreas de infiltrado inflamatório foram evitadas. As imagens dos campos foram feitas no aumento de 100X e submetidas à três tipos de análise:

#### **4.5.3.1 Análise Quantitativa de Patched**

Para obtenção da porcentagem de células marcadas em cada caso, todas as células do epitélio de cada campo foram contadas e obteve-se o somatório do número total de células que foi dividido pelo número de campos analisados (obtendo-se a razão para campo).

Posteriormente, contaram-se apenas as células imunomarcadas de cada campo, obteve-se o somatório do número total de células marcadas que também foi dividido pelo número de campos analisados (obtendo-se a razão para campo das células imunomarcadas). Dividiu-se a razão para campo de células imunomarcadas pela razão para campo do total de células e depois multiplicou-se por 100 para se obter a porcentagem de células marcadas (Ficha de coleta no APÊNDICE D). Os valores de porcentagem encontrados eram classificados por escore, sendo que o escore 1 representa 0 a 25% de células marcadas; 2 representa 26% a 50%; 3 representa 51% a 75% e o escore 4 representa 76% a 100% de células marcadas (tabela 01).

**Tabela 01: Escore adotado para avaliação quantitativa da imuno-histoquímica.**

<b>Escore</b>	<b>Porcentagem de células imunomarcadas</b>
1	0 - 25%
2	26% - 50%
3	51% - 75%
4	76% - 100%

As células foram contadas utilizando-se o software Image J.

#### **4.5.3.2 Análise Semi-quantitativa de Patched (imunomarcção de estratos)**

Para a obtenção da porcentagem de marcação de camadas em cada caso, registrou-se a imunomarcção quando esta estava presente na camada basal, camada intermediária (espinhosa mais granulosa) e camada superficial e obteve-se o somatório do número de campos que apresentavam imunomarcção na camada basal, intermediária e superficial e dividiu-se esta soma pelo número de campos analisados e obteve-se a razão para campo. Multiplicando-se este valor por 100, obteve-se a porcentagem de marcação nas camadas basal, intermediária e superficial (Ficha de coleta no APÊNDICE E). Estes dados também foram classificados por escore obtido em cada camada (basal, intermediária e superficial), sendo que o escore 1 representa 0 a 25% de camadas marcadas; 2 representa 26% a 50%; 3 representa 51% a 75% e o escore 4 representa 76% a 100% de camadas marcadas (tabela 02).

**Tabela 02: Escore adotado para avaliação semi-quantitativa da imuno-histoquímica.**

<b>Escore</b>	<b>Porcentagem de camadas imunomarcadas</b>
1	0 - 25%
2	26% - 50%
3	51% - 75%
4	76% - 100%

#### **4.5.3.3 Análise Qualitativa de Patched (imunomarcação celular)**

Para a avaliação qualitativa de Patched considerando-se a unidade celular, registrou-se a imunomarcação quando esta estava presente na membrana plasmática, citoplasma ou núcleo (Ficha de coleta no APÊNDICE F).

#### **4.5.4 Análise Estatística**

As informações provenientes da análise de lâminas coradas com HE, Alcian Blue e submetidas à técnica imuno-histoquímica, juntamente com os dados clinicopatológicos, passaram por análise estatística, com o objetivo de relacionar o padrão de marcação de patched nos tumores com as características destas lesões, especialmente dados relativos ao grau de agressividade e recorrência dos tumores.

Para relacionar a maior expressão da proteína Patched (representada pelo escore 4) com a localização das lesões (sindrômicas, não-sindrômicas e das lesões em geral), utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para relacionar a presença de fatores preditivos (figuras mitóticas, brotamento, microcisto e ilhas epiteliais) (que estão relacionados à agressividade e recidiva da lesão) com a expressão aumentada da proteína Patched, utilizou-se o teste Exato de Fisher. Para verificar se estes fatores são mais frequentes em tumores sindrômicos ou não-sindrômicos, obteve-se as frequências absolutas e as porcentagens da presença destes fatores preditivos. No intuito de verificar as diferenças entre as proporções, se requereu ao teste Z para as duas proporções.

Quanto à quantificação de mastócitos, para verificar se houve diferença significativa entre as médias obtidas nos dois grupos (sindrômico e não-sindrômico), foi requerido o teste *t* de Student para amostras independentes.

Para avaliar se na análise de estratos houve diferença significativa entre os valores encontrados de escore 4 nas camadas basal, intermediária e superficial de lesões sindrômicas e não-sindrômicas e para verificar em qual camada a proteína Patched é mais intensa (basal, intermediária e superficial) nos tumores em geral, se requereu ao teste Z.

O nível de significância assumido foi o de 5% ( $p < 0,05$ ) e intervalo de confiança de 95%. O programa utilizado nas análises foi o IBM SPSS *Statistics version 21*.



## 5 Resultados

### 5.1 Dados Gerais dos Pacientes

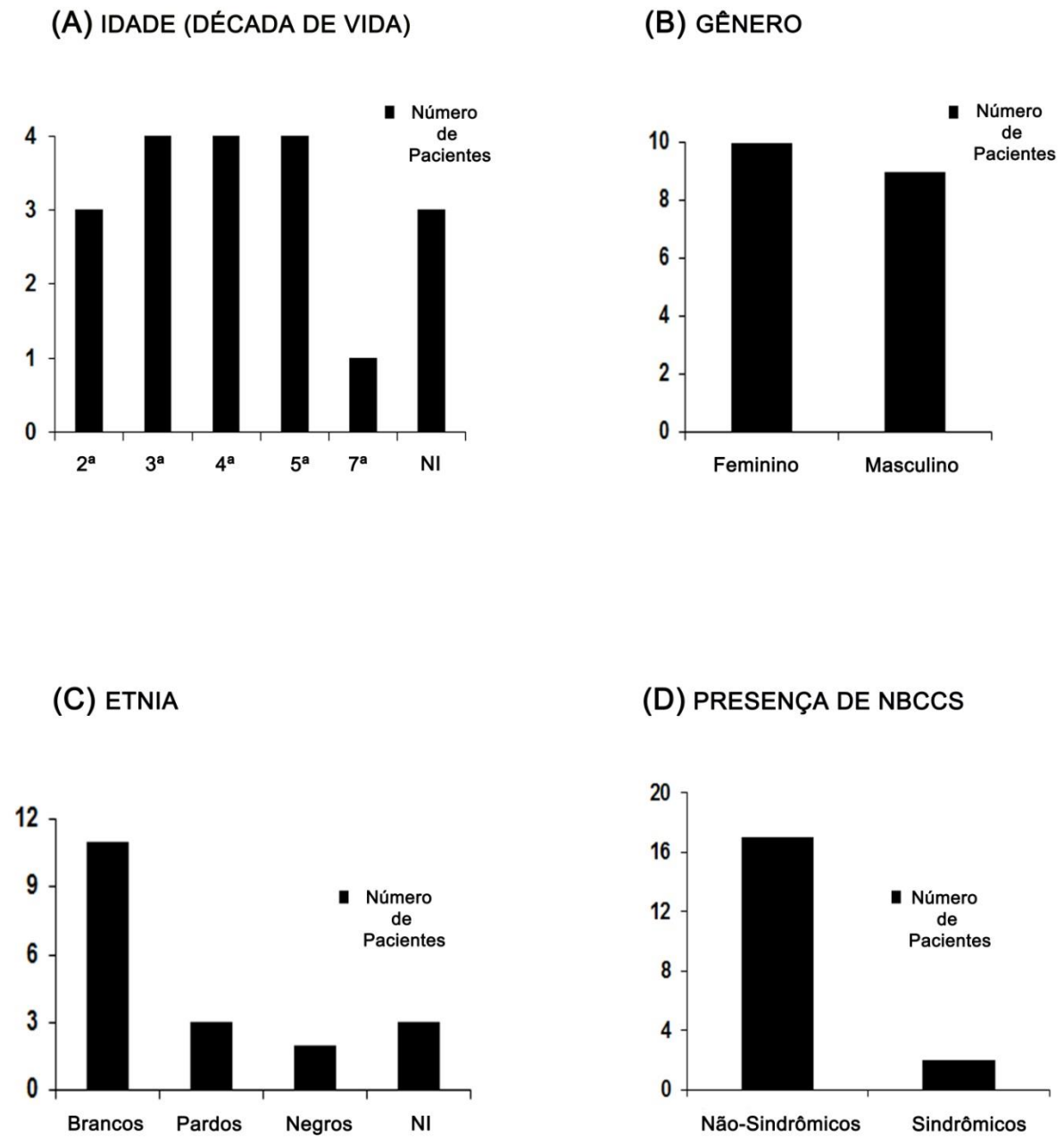
Da seleção dos casos de pacientes diagnosticados com KCOT durante o período de março de 2004 a dezembro de 2012 no SAP (Serviço de Anatomia Patológica) da UFES, foi encontrado um total de 19 pacientes e 28 tumores.

A faixa etária encontrada variou de 14 a 78 anos. A média de idade foi de 28,5 anos. Houve uma distribuição equivalente de pacientes na 3ª, 4ª e 5ª décadas de vida, nas quais se concentrou a maior parte dos pacientes (63,16%) (Figura 06).

Quanto ao gênero, não houve diferença relevante na distribuição de pacientes, sendo que 52,63% dos pacientes (N=10) são do sexo feminino e 47,37% (N=9) são do sexo masculino (Figura 06).

Quanto à etnia, a maioria dos pacientes é constituída por brancos (57,90%), sendo a minoria composta por negros (10,52%). Pacientes pardos e casos não-informados compõem os 31,58% restantes (Figura 06).

Dos 19 pacientes, 89,47% (N=17) são não-sindrômicos e 10,52% (N=2) apresentam a síndrome NBCSS (Figura 06).



**Figura 06: Dados gerais dos pacientes portadores de KCOT avaliados.** A: Idade (distribuída entre as décadas de vida). B: Gênero. C: Etnia. D: Presença ou ausência da NBCCS.

## 5.2 Dados Clinicopatológicos

Quanto às informações pertinentes às lesões, foi encontrado um total de 28 tumores, sendo 67,86% (19 KCOTs) não-sindrômicos e 32,14% (9 KCOTs) sindrômicos (Figura 07).

Quanto à localização das lesões; 71,43 % (20 KCOTs) estão localizadas na mandíbula: 75% não-sindrômicas (N=15) e 25% sindrômicas (N=5) e 28,57% (8 KCOTs) estão localizadas na maxila: 50% não-sindrômicas (N=4) e 50% sindrômicas (N=4) (Figura 07).

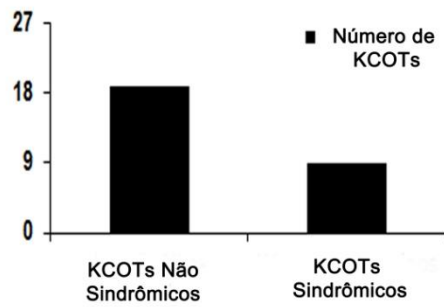
Quanto à distribuição das lesões na maxila, entre os tumores não-sindrômicos, 100% (N=4) encontram-se na região anterior, sendo que 50% deles encontram-se restritos à região anterior (N=2). Nos casos restantes, a lesão se estende a outras regiões. Entre os tumores sindrômicos, 75% (N=3) encontram-se na região de molares (Figura 07).

Quanto à distribuição das lesões na mandíbula, entre os tumores não-sindrômicos, 66,66% (N=10) encontram-se na região de corpo, sendo que 53,33% (N=8) encontram-se apenas na região de corpo. O restante das lesões encontra-se distribuído entre região mentoniana (20%), associação de corpo e ramo (13,33%) e casos não informados (13,33%).

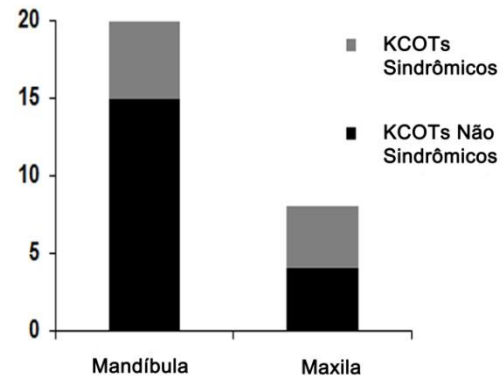
Entre as lesões sindrômicas, 80% (N=4) dos tumores encontram-se na região de corpo, sendo que em 60% (N=3) dos casos a lesão se estende a outras regiões (corpo e ramo, mento e corpo). Os casos não informados compõem 20% (N=1) (Figura 07).

Não foi encontrada nenhuma recidiva dos casos analisados no período em questão.

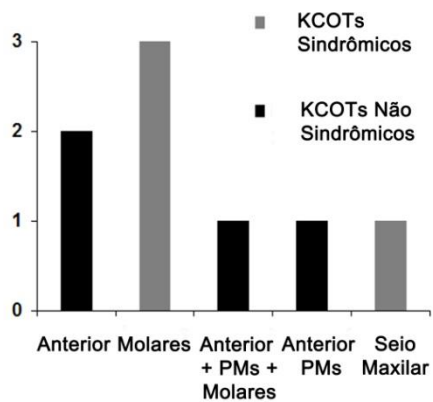
(A) TIPO DE TUMOR



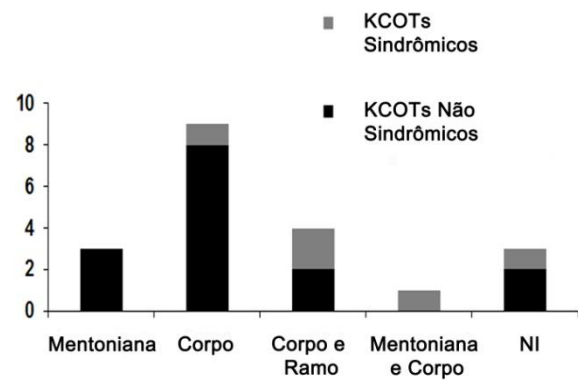
(B) LOCALIZAÇÃO DOS KCOTS NAS ARCADAS



(C) DISTRIBUIÇÃO DOS KCOTS NA MAXILA



(D) DISTRIBUIÇÃO DOS KCOTS NA MANDÍBULA



**Figura 07: Dados clinicopatológicos avaliados.** A: Tipo de tumor (síndrômico ou não-síndrômico). B: Localização dos tumores nas arcadas. C: Distribuição dos tumores na maxila. D: Distribuição dos tumores na mandíbula.

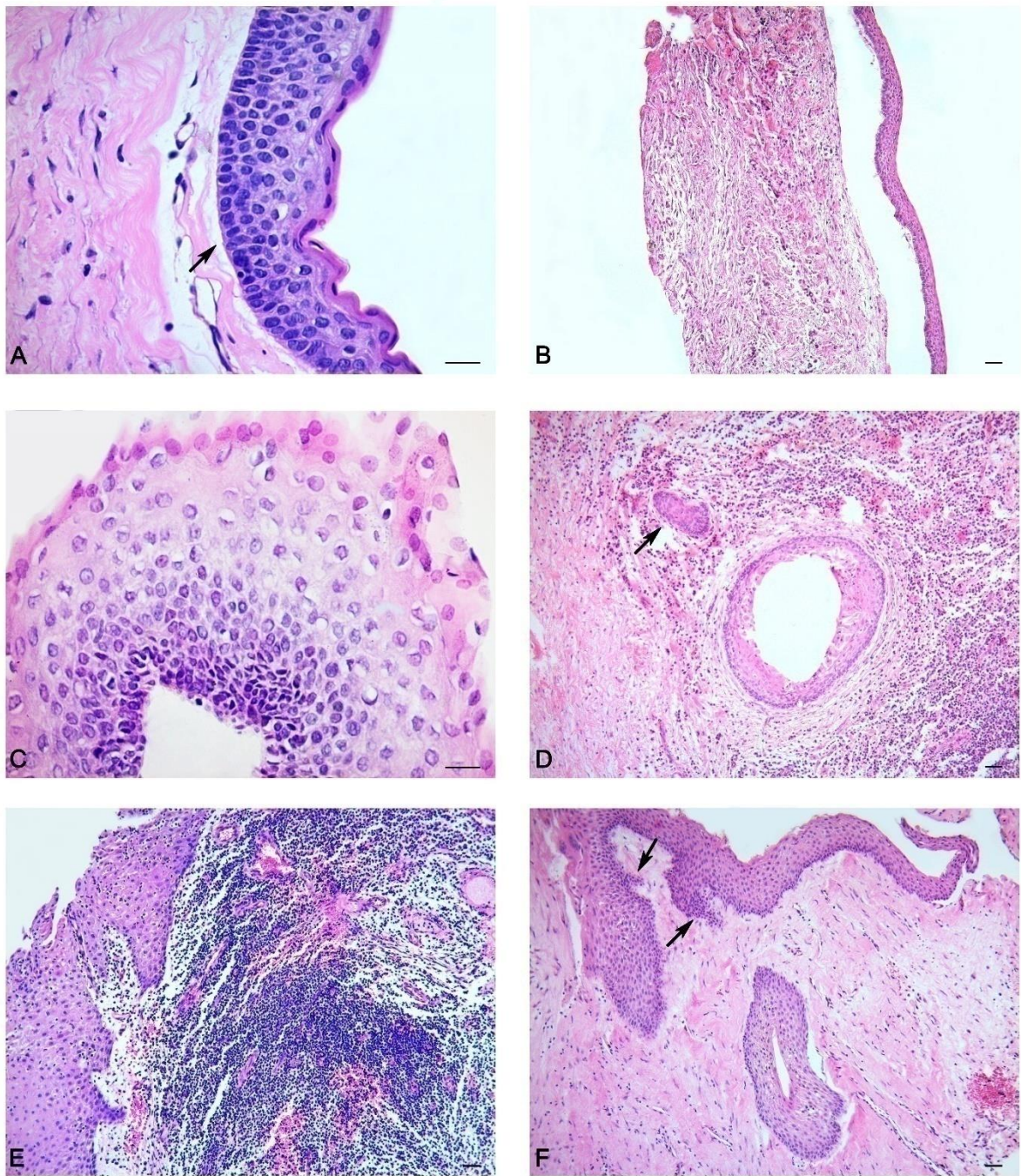
### 5.3 Dados Histopatológicos

Os dados referentes às características histopatológicas encontram-se distribuídos na tabela 03. Estas características foram encontradas em maior porcentagem nos tumores síndrômicos, principalmente os fatores preditivos, como figuras mitóticas (presente em 100% dos casos), microcistos (em 33,33% dos casos), brotamento (em 77,77% dos casos) e ilhas de epitélio odontogênico (presente em 77,77% dos casos) (ilustração na figura 08). Nos tumores não-síndrômicos, a porcentagem encontrada foi de 89,47%, 10,52%, 47,36% e 36,84%, respectivamente.

**Tabela 03: Características histopatológicas avaliadas nas lesões de KCOT.**

<b>Características Histopatológicas</b>	<b>Lesões Não-Síndrômicas (N=19)</b>	<b>Lesões Síndrômicas (N=9)</b>	<b>Total de lesões (N=28)</b>
Presença de camada basal de células cubóides ou colunares bem definida, frequentemente em paliçada;	84,21% (N=16)	100% (N=9)	89,285% (N=25)
Presença de núcleos das células basais intensamente basofílicos, orientados no sentido contrário ao da membrana basal;	52,63% (N=10)	100% (N=9)	67,857% (N=19)
Epitélio escamoso estratificado paraqueratinizado regular sem cristas epiteliais;	52,63% (N=10)	88,88% (N=8)	64,285% (N=18)
Epitélio com 5-8 camadas de espessura;	94,73% (N=18)	88,88% (N=8)	92,857% (N=26)
Presença de epitélio estratificado paraqueratinizado, com uma superfície frequentemente ondulada;	73,68% (N=14)	77,77% (N=7)	75% (N=21)
Presença de figuras mitóticas nas camadas suprabasais;	89,47% (N=17)	100% (N=9)	92,857% (N=26)
Presença de microcistos (cistos satélites ou cistos-filha);	10,526% (N=2)	33,33% (N=3)	17,857% (N=5)
Presença de brotamento de proliferação do epitélio;	47,368% (N=9)	77,77% (N=7)	57,1428% (N=16)
Presença de ilhas de epitélio odontogênico (em fileiras ou pequenos grumos, sem formar microcistos);	36,84% (N=7)	77,77% (N=7)	50% (N=14)
Parede fibrosa fina;	94,736% (N=18)	100% (N=9)	96,428% (N=27)
Presença de infiltrado inflamatório;	68,421% (N=13)	88,88% (N=8)	75% (N=21)
Perda das características celulares e arquiteturais na presença de infiltrado inflamatório;	47,368% (N=9)	77,77% (N=7)	57,1428% (N=16)
Separação da junção epitélio-conjuntivo.	89,473% (N=17)	77,77% (N= 7)	85,714% (N=24)





**Figura 08: Características histopatológicas do KCOT avaliadas.** Camada de células basais colunares ou cubóides com núcleos em paliçada, orientados no sentido contrário ao da membrana basal (seta); epitélio estratificado paraqueratinizado, com superfície corrugada; ausência de cristas epiteliais (A). Parede fibrosa fina e separação da junção epitélio-conjuntivo (B). Atividade mitótica nas camadas suprabasais (C). Presença de cisto-filha e ilha de epitélio odontogênico (seta) (D). Presença de infiltrado inflamatório com perda das características histológicas típicas do KCOT (E). Cisto-filha e presença de brotamento a partir do epitélio (seta) (F). Coloração de Hematoxilina & Eosina. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

A análise das porcentagens encontradas para estes fatores apresentou diferenças significativas entre a variante sindrômica e não-sindrômica, indicando que estas características foram mais frequentes no tipo sindrômico (tabela 04).

**Tabela 04: Comparação entre os valores encontrados para fatores preditivos em KCOTs sindrômicos e não-sindrômicos.**

<b>Fatores Preditivos</b>	<b>KCOTs Sindrômicos (n=9)</b>	<b>KCOTs Não-sindrômicos (n=19)</b>	<b>Valor p*</b>
Figuras Mitóticas	100% (n=9)	89,47% (n=17)	0.003
Microcistos	33,33% (n=3)	10,52% (n=2)	< 0.001
Brotamento	77,77% (n=7)	47,36% (n=9)	< 0.001
Ilhas epiteliais	77,77% (n=7)	36, 84% (n=7)	< 0.001

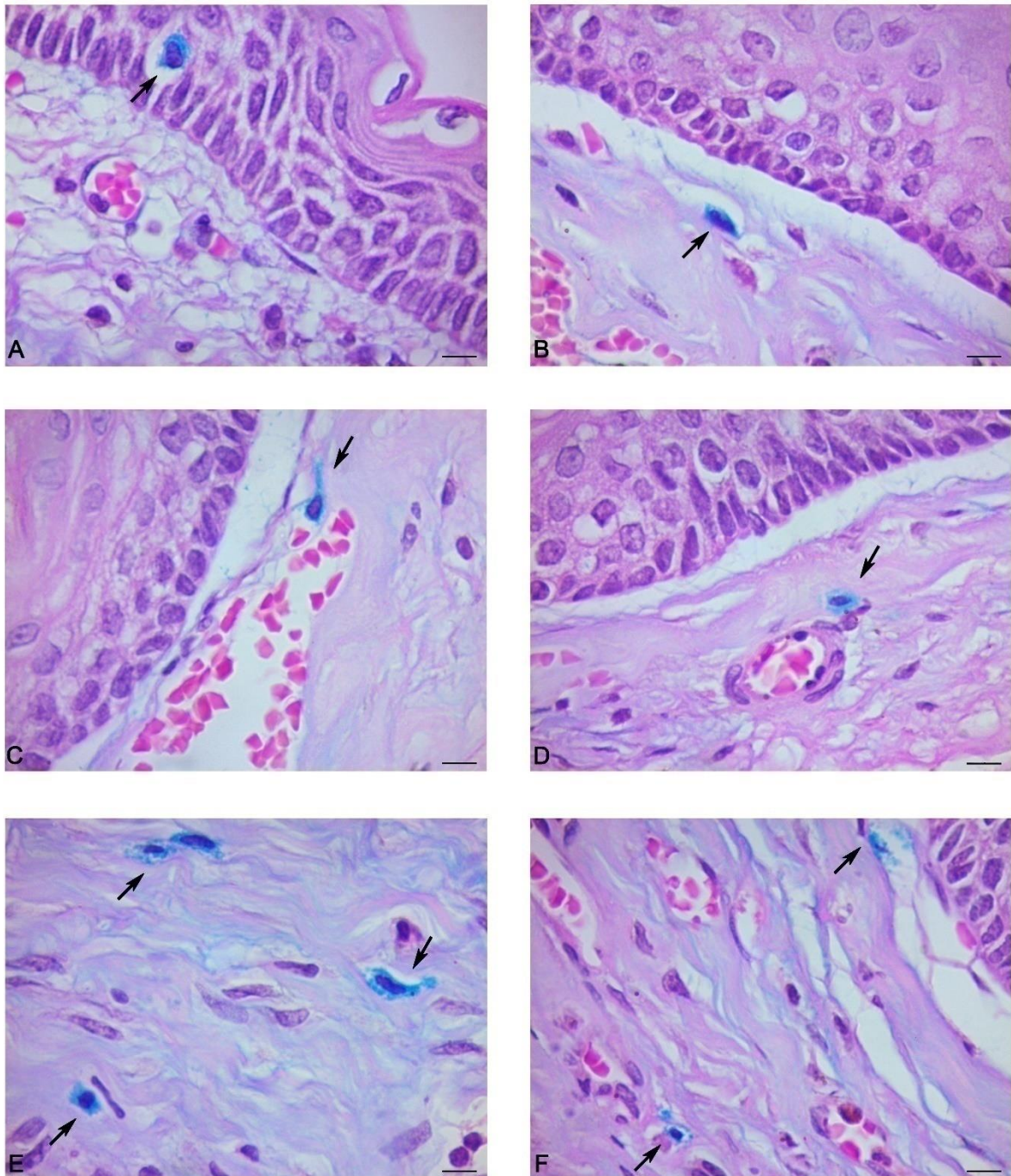
\* Teste Z para duas proporções.

#### **5.4 Distribuição dos Mastócitos nos KCOTs**

Ao observarmos as lesões coradas por Alcian Blue foi possível identificar os mastócitos através do microscópio de luz como células globosas, com citoplasma repleto de grânulos de secreção bastante evidentes, corados de azul (Figura 09). Estas células foram localizadas nos KCOTs próximas ao epitélio (ou mesmo intraepiteliais), no tecido conjuntivo e ao redor de vasos sanguíneos. Pode-se observar também alguns mastócitos em degranulação, liberando seu conteúdo intracelular.

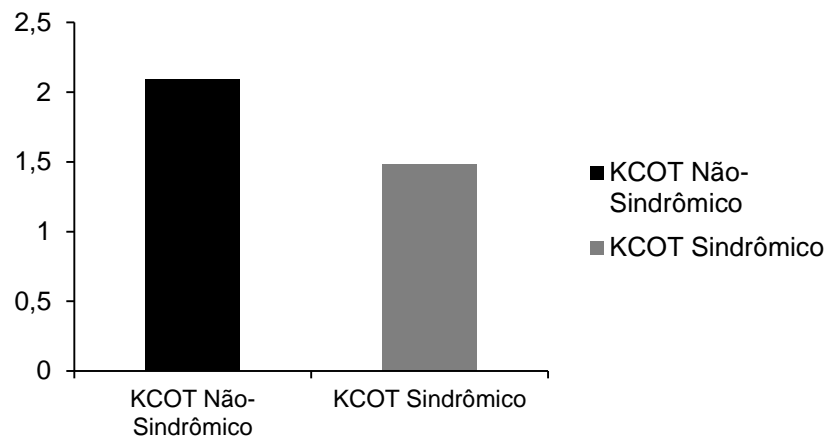
A média de mastócitos por campo analisado, encontrada para tumores não-sindrômicos foi de 2,09. Para tumores sindrômicos, este valor foi de 1,48 (gráfico 01). Não houve diferença significativa entre estes dois valores encontrados (tabela 05).





**Figura 09: Distribuição dos mastócitos nos KCOTs.** Mastócito localizado na região intraepitelial (A). Mastócito isolado na lâmina própria (B). Mastócitos ao redor de vasos sanguíneos (C e D). Mastócitos localizados no tecido conjuntivo (E). Mastócitos em degranulação, liberando seu conteúdo citoplasmático (F). Coloração com Alcian Blue. Barra de escala=20 μm.





**Gráfico 01:** Média de Mastócitos por campo analisado nas lesões de KCOT síndrômicas e não síndrômicas.

**Tabela 05:** Comparação da diferença entre a quantidade média de mastócitos entre os KCOTs síndrômicos e não síndrômicos.

	Média	Desvio padrão	Valor p
KCOTs Síndrômicos	1.48	0.38	0.070
KCOTs Não-Síndrômicos	2.09	0.94	

## **5.5 Análise Quantitativa de Patched**

Para análise da imunoexpressão de Patched foram analisados 27 casos, sendo 18 não-sindrômicos e 9 sindrômicos. Um caso foi excluído devido à ausência de material para análise.

Foi obtida a porcentagem de células marcadas em cada caso e os dados foram agrupados por escore (tabela 06).

A maior parte dos tumores, tanto sindrômico como não-sindrômico apresentou escore 4 de marcação (77,77% dos casos, nos 2 tipos de lesão) (Figura 10). Nenhuma lesão apresentou escore 2 (tabela 07).

## **5.6 Análise Semi-quantitativa de Patched (imunomarcção de estratos)**

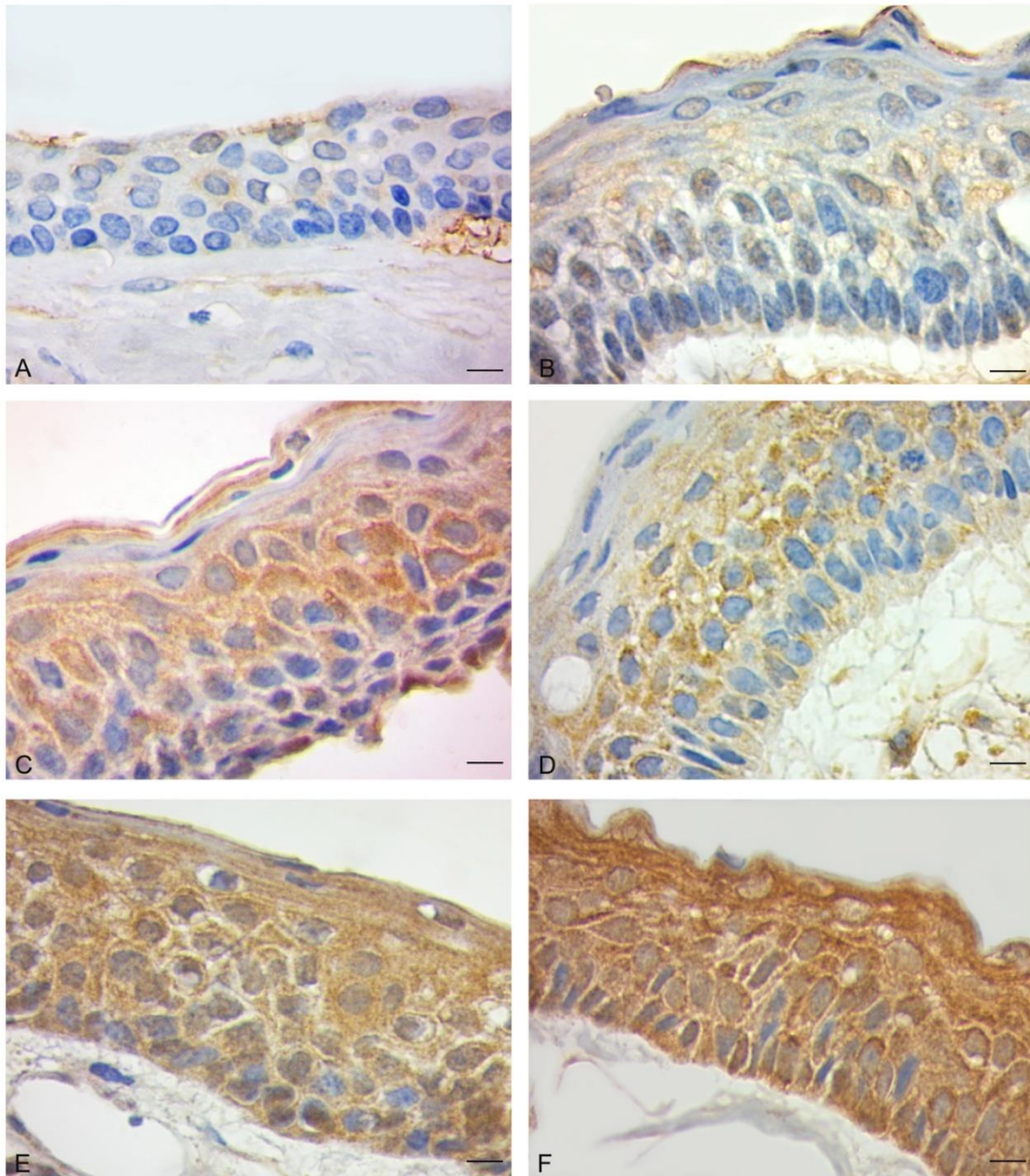
Foi obtida a porcentagem de marcação nas camadas basal, intermediária e superficial de cada tumor e os dados também foram agrupados por escore (tabela 08). Em um mesmo caso era possível verificar a imunomarcção em mais de um estrato (Figura 11).

Nos tumores não-sindrômicos, o valor de escore 4 predominou nas camadas basal e intermediária (72,225% e 77,77% dos casos, respectivamente) sendo que na camada superficial o valor encontrado para o escore 4 foi equivalente ao do escore 1 (38,88% dos casos) (tabela 09).

Nos tumores sindrômicos, o valor de escore 4 também predominou nas camadas basal e intermediária (66,66% e 88,88% dos casos, respectivamente) sendo que na camada superficial o valor encontrado para o escore 4 foi equivalente ao do escore 1 (44,44% dos casos) (tabela 09).

**Tabela 06: Porcentagem de células marcadas por anticorpo para PTCH em cada KCOT.**

<b>Nº do Paciente</b>	<b>Nº da Lesão</b>	<b>Porcentagem de Células Marcadas</b>	<b>Escore</b>
Paciente 1	Lesão 1	61,847%	3
Paciente 2	Lesão 2	99,51%	4
Paciente 3	Lesão 3	96,028%	4
Paciente 4 (Sindrômico)	Lesão 4	95,966%	4
	Lesão 5	95,240%	4
	Lesão 6	91,205%	4
	Lesão 7	80,487%	4
Paciente 5	Lesão 8	98,791%	4
Paciente 6	Lesão 9	81,786%	4
Paciente 7	Lesão 10	93,23%	4
Paciente 8	Lesão 11	95,03%	4
	Lesão 12	94,24%	4
Paciente 9	Lesão 13	78,135%	4
Paciente 10	Lesão 14	76,819%	4
	Lesão 15	80,522%	4
Paciente 11	Lesão 16	86,315%	4
Paciente 12 (Sindrômico)	Lesão 17	92,288%	4
	Lesão 18	79,748%	4
	Lesão 19	60,99%	3
	Lesão 20	5,16%	1
	Lesão 21	90,414%	4
Paciente 13	Lesão 22	95,89%	4
Paciente 14	Lesão 23	97,046%	4
Paciente 15	Lesão 24	89,331%	4
Paciente 16	Lesão 25	1,9553%	1
Paciente 17	Lesão 26	13,401%	1
Paciente 18	Lesão 27	54,41%	3
Paciente 19	Lesão 28	Sem material para análise	-



**Figura 10: Ilustração do padrão de imunomarcacão de Patched com atribuição de scores.**

A e B: Escore 1. C e D: Escore 3. E e F: Escore 4. A, C e E representam imagens de KCOT não-sindrômicos; B, D e F são imagens representativas de KCOT síndrômicos. Contraste com Hematoxilina de Mayer. Barra de escala: 20 µm.

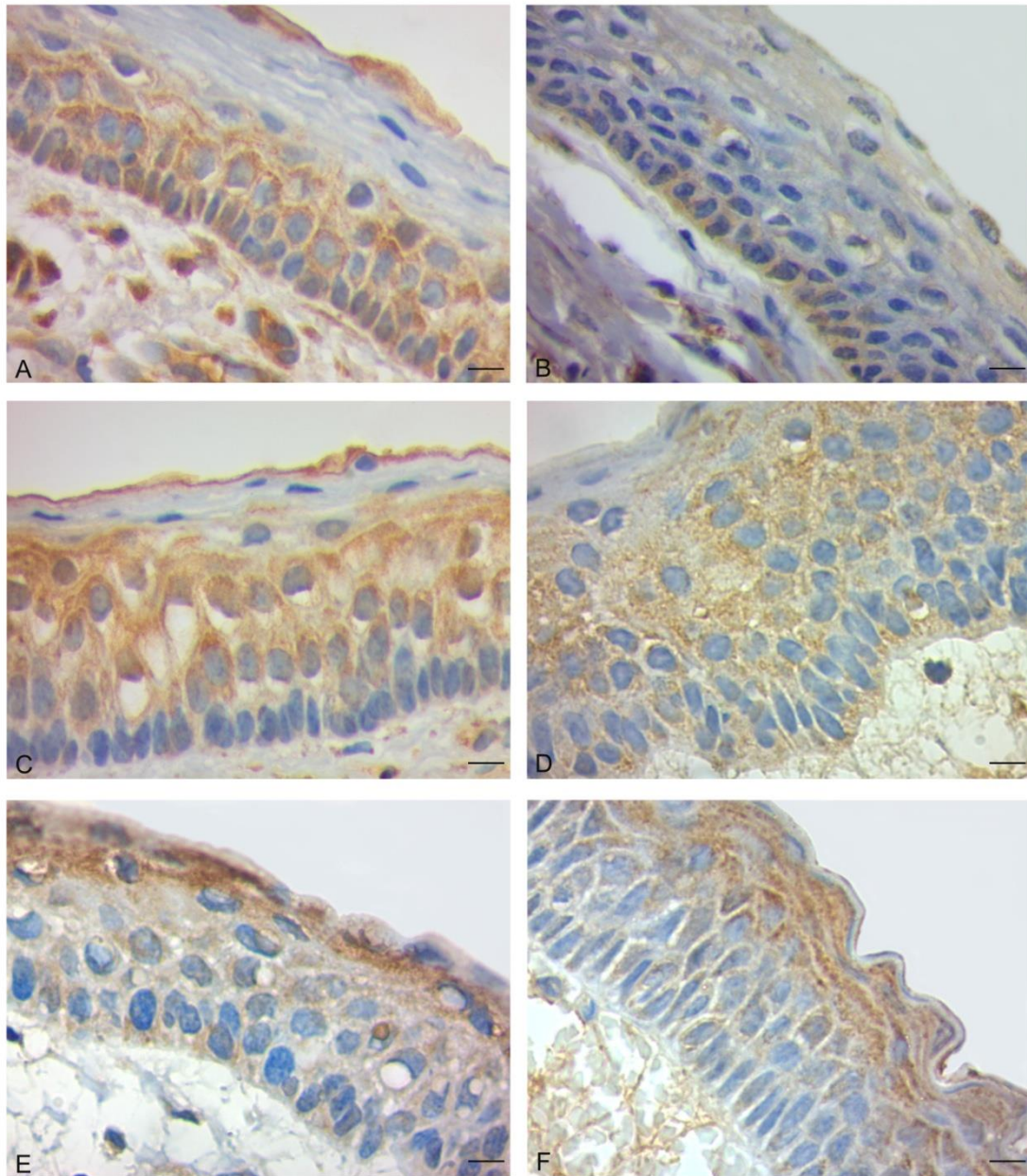
**Tabela 07: Agrupamento das lesões analisadas quantitativamente de acordo com o escore estabelecido.**

	Porcentagem de casos para cada escore
<b>Lesões</b>	Escore 4 - 77,77% (N=14)
<b>Não-Sindrômicas</b>	Escore 3 - 11,11% (N=2)
<b>(N=18)</b>	Escore 2 - 0% (N=0)
	Escore 1 - 11,11% (N=2)
<b>Lesões Sindrômicas</b>	Escore 4 - 77,77% (N=7)
<b>(N=9)</b>	Escore 3 - 11,11% (N=1)
	Escore 2 - 0% (N=0)
	Escore 1 - 11,11% (N=1)

Nesta análise dos estratos, as porcentagens de escore 4 encontradas nas camadas basal, intermediária e superficial de tumores sindrômicos e não-sindrômicos não apresentaram diferenças significativas entre estes dois grupos (ou seja, não houve diferença entre o valor de imunomarcagem de Patched encontrado na camada basal da lesão sindrômica e na camada basal da lesão não-sindrômica, o que ocorreu também com as camadas intermediária e superficial) (tabela 10).

**Tabela 08: Porcentagem de estratos marcados por anticorpo para PTCH em cada KCOT.**

Nº do Paciente	Nº da Lesão	Porcentagem de Marcação	Escore	Porcentagem de Marcação	Escore	Porcentagem de Marcação	Escore
		Camada Basal (B)	B	Camada Intermediária (I)	I	Camada Superficial (S)	S
Paciente 1	Lesão 1	30,769%	2	92,307%	4	38,461%	2
Paciente 2	Lesão 2	100%	4	100%	4	100%	4
Paciente 3	Lesão 3	91,66%	4	100%	4	100%	4
Paciente 4 (Sindrômico)	Lesão 4	100%	4	100%	4	88,88%	4
	Lesão 5	100%	4	97,5%	4	77,5%	4
	Lesão 6	100%	4	100%	4	50%	2
	Lesão 7	90%	4	90%	4	20%	1
Paciente 5	Lesão 8	100%	4	100%	4	100%	4
Paciente 6	Lesão 9	95%	4	100%	4	5%	1
Paciente 7	Lesão 10	100%	4	100%	4	0%	1
Paciente 8	Lesão 11	100%	4	100%	4	22,22%	1
	Lesão 12	92,857%	4	92,857%	4	57,14%	3
Paciente 9	Lesão 13	88,88%	4	100%	4	88,88%	4
Paciente 10	Lesão 14	66,66%	3	66,66%	3	83,333%	4
	Lesão 15	95%	4	95%	4	2%	1
Paciente 11	Lesão 16	82,352%	4	94,1176%	4	35,294%	2
Paciente 12 (Sindrômico)	Lesão 17	100%	4	100%	4	0%	1
	Lesão 18	73,684%	3	100%	4	100%	4
	Lesão 19	33,33%	2	100%	4	0%	1
	Lesão 20	0%	1	17,647%	1	17,647%	1
	Lesão 21	100%	4	94,44%	4	88,885%	4
Paciente 13	Lesão 22	100%	4	100%	4	66,66%	3
Paciente 14	Lesão 23	100%	4	100%	4	100%	4
Paciente 15	Lesão 24	86,665%	4	93,33%	4	93,33%	4
Paciente 16	Lesão 25	0%	1	0%	1	0%	1
Paciente 17	Lesão 26	42,105%	2	0%	1	0%	1
Paciente 18	Lesão 27	60%	3	60%	3	0%	1
Paciente 19	Lesão 28	Sem material para análise	-	-	-	-	-



**Figura 11: Imunorreatividade de Patched nas camadas epiteliais.** Na camada basal (A e B); na camada intermédia (C e D); na camada superficial (E e F). KCOT Não-sindrômico (A, B, C e E); KCOT Síndrômico (D e F). Imunomarcção em mais de um extrato (basal e intermediário) (A). Barra de escala=20  $\mu$ m.



**Tabela 09: Agrupamento das lesões analisadas semi-quantitativamente de acordo com o escore estabelecido.**

	<b>Camada Basal</b>	<b>Camada Intermediária</b>	<b>Camada Superficial</b>
<b>Lesões</b>	Escore 4 - 72,22% (N=13)	Escore 4 - 77,77% (N=14)	Escore 4 - 38,88% (N=7)
<b>Não-</b>	Escore 3 - 11,11% (N=2)	Escore 3 - 11,11% (N=2)	Escore 3 - 11,11% (N=2)
<b>Sindrômicas</b>	Escore 2 - 11,11% (N=2)	Escore 2 - 0% (N=0)	Escore 2 - 11,11% (N=2)
<b>(N=18)</b>	Escore 1 - 5,55% (N=1)	Escore 1 - 11,11% (N=2)	Escore 1 - 38,88% (N=7)
<b>Lesões</b>	Escore 4 - 66,66% (N=6)	Escore 4 - 88,88% (N=8)	Escore 4 - 44,44% (N=4)
<b>Sindrômicas</b>	Escore 3 - 11,11% (N=1)	Escore 3 - 0% (N=0)	Escore 3 - 0% (N=0)
<b>(N=9)</b>	Escore 2 - 11,11% (N=1)	Escore 2 - 0% (N=0)	Escore 2 - 11,11% (N=1)
	Escore 1 - 11,11% (N=1)	Escore 1 - 11,11% (N=1)	Escore 1 - 44,44% (N=4)

**Tabela 10: Comparação entre os escores 4 de PTCH encontrados nos estratos do grupo síndrômico e não-síndrômico.**

<b>Tipo de Lesão</b>	<b>Estratos</b>	<b>Valor p</b>
	<b>Basal</b>	
KCOTs Síndrômicos	6 (66.7)	0.766
KCOTs Não-síndrômicos	13 (72.2)	
	<b>Intermediário</b>	
KCOTs Síndrômicos	8 (88.9)	0.484
KCOTs Não-síndrômicos	14 (77.8)	
	<b>Superficial</b>	
KCOTs Síndrômicos	4 (44.4)	0.782
KCOTs Não-síndrômicos	7 (38.9)	

\* Teste Z para duas proporções.

Nota: Entre parênteses as porcentagens.



Ao analisarmos em qual camada a expressão de Patched foi mais intensa nos tumores da amostra, constatamos que o estrato superficial obteve menor porcentagem de escore 4 em comparação ao basal ( $p = 0.028$ ) e ao intermediário ( $p = 0.002$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de marcação encontradas para o estrato basal e o intermediário dos tumores (tabelas 11 e 12).

**Tabela 11: Agrupamento das lesões analisadas semi-quantitativamente de acordo com o escore estabelecido.**

	<b>Camada Basal</b>	<b>Camada Intermediária</b>	<b>Camada Superficial</b>
<b>Lesões</b>	Escore 4 - 70,37% (N=19)	Escore 4 - 81,48% (N=22)	Escore 4 - 40,74% (N=11)
<b>(Total)</b>	Escore 3 - 11,11% (N=3)	Escore 3 - 7,41% (N=2)	Escore 3 - 7,41% (N=2)
<b>(N=27)</b>	Escore 2 - 11,11% (N=3)	Escore 2 - 0% (N=0)	Escore 2 - 11,11% (N=3)
	Escore 1 - 7,41% (N=2)	Escore 1 - 11,11% (N=3)	Escore 1 - 40,74% (N=11)

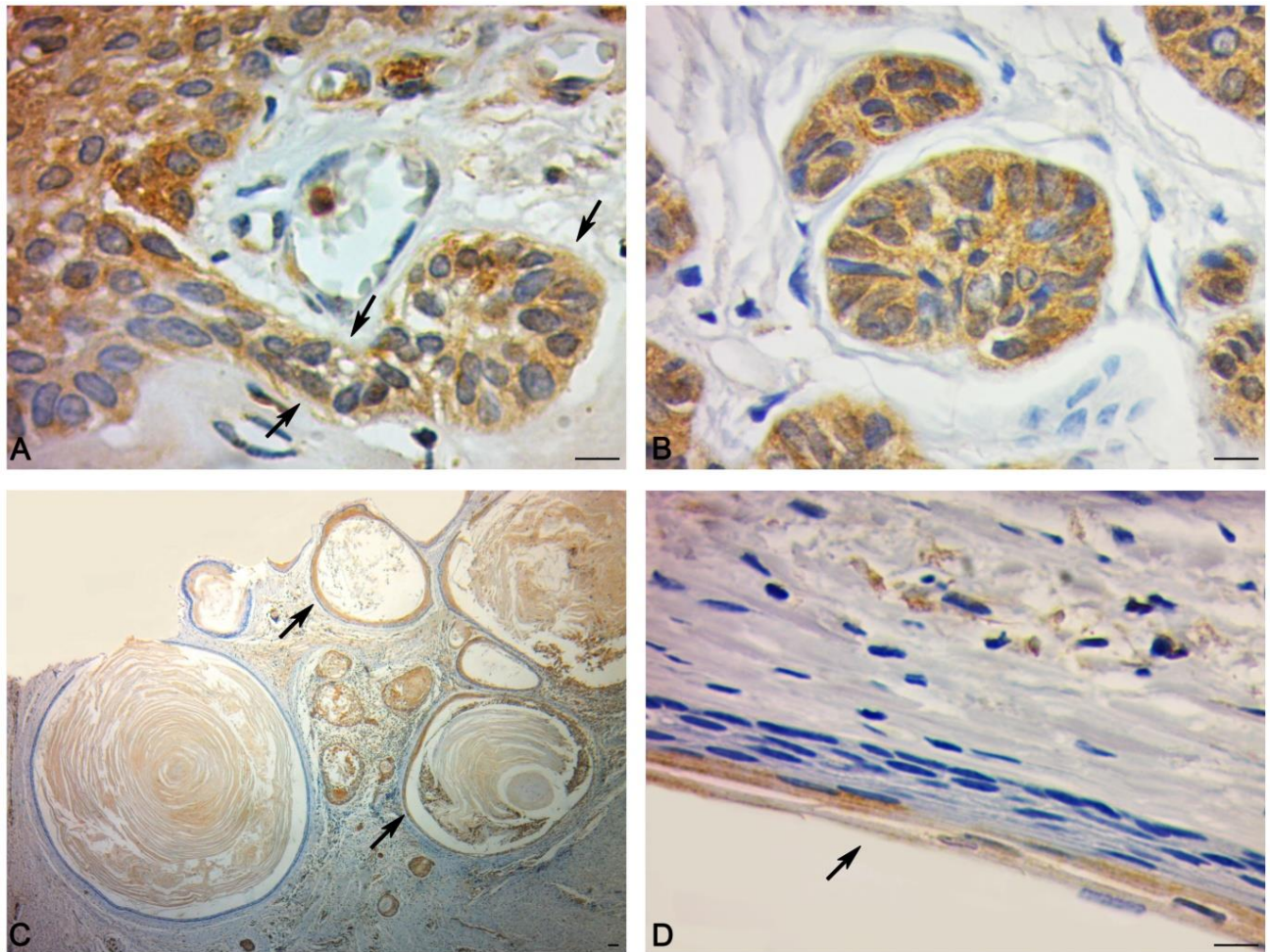
**Tabela 12: Comparação entre os escores 4 para PTCH e os estratos dos KCOTs.**

	<b>Geral</b>		<b>Valor p*</b>
<b>Basal</b>		<b>Intermediária</b>	
19 (70.4)		22 (81.5)	0.340
<b>Basal</b>		<b>Superficial</b>	
19 (70.4)		11 (40.7)	<b>0.028</b>
<b>Intermediária</b>		<b>Superficial</b>	
22 (81.5)		11 (40.7)	<b>0.002</b>

\* Teste Z para duas proporções.

Nota: Entre parênteses as porcentagens.

Além da marcação em estratos, a expressão de Patched nos KCOTs também pode ser observada em brotamento, ilhas de epitélio odontogênico e cistos-filha (Figura 12).



**Figura 12: Imunoexpressão de Patched:** Em brotamento (setas) (A), em ilhas de epitélio odontogênico (B) e em cistos-filha (C e D). Barra de escala=20  $\mu$ m.

### 5.7 Análise Qualitativa de Patched (imunomarcção celular)

Ao analisarmos a expressão da proteína Patched no compartimento celular, embora esta proteína seja transmembrana, não foi encontrada marcação membranar ou nuclear. A imunomarcção de Patched foi observada apenas no citoplasma da célula (Figura 13).

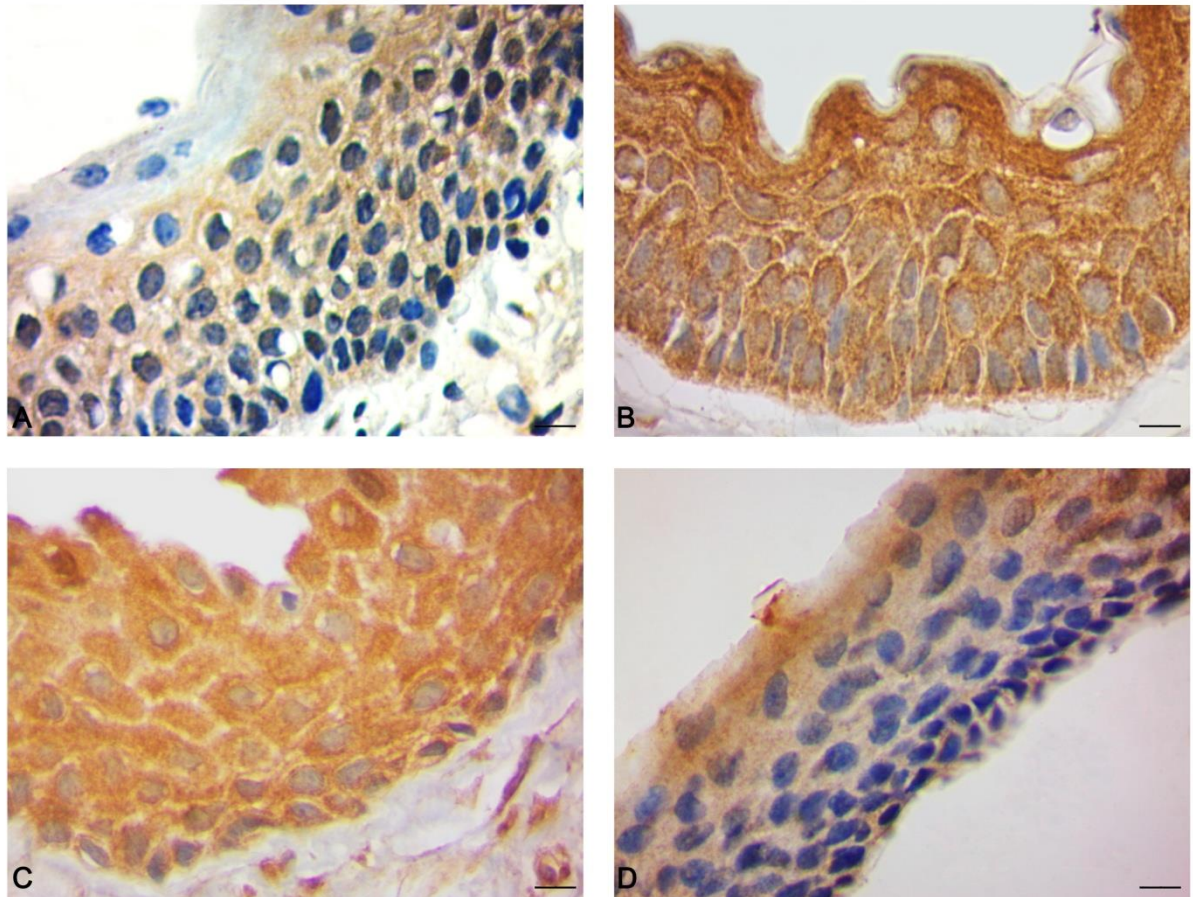
### 5.8 Análise Estatística

Ao analisarmos em qual região houve maior expressão de Patched, constatou-se que o escore 4 (que representa o valor máximo atribuído a imunomarcção desta proteína) foi o mais frequente, tanto na maxila quanto na mandíbula e não se sobressaiu em nenhuma destas regiões, tanto no grupo de lesões síndrômicas como não-síndrômicas (tabela 13).

**Tabela 13: Comparação entre as regiões da lesão e o escore para Patched pelo teste de Mann-Whitney.**

		Escore para Patched (PTCH)						Valor p
		1		3		4		
		N	%	N	%	N	%	
KCOTs Síndrômicos	Mandíbula	1	20.0	0	0.0	4	80.0	0.999
	Maxila	0	0.0	1	25.0	3	75.0	
KCOTs Não-síndrômicos	Mandíbula	1	7.1	2	14.3	11	78.6	0.762
	Maxila	1	25.0	0	0.0	3	75.0	
KCOTs	Mandíbula	2	10.5	2	10.5	15	78.9	0.927
	Maxila	1	12.5	1	12.5	6	75.0	

Em relação aos fatores preditivos (figuras mitóticas, brotamento, microcisto e ilhas epiteliais), ao analisarmos se a expressão aumentada de PTCH (escore 4) está relacionada à presença destas características, constatou-se que não houve relação entre a forte imunomarcção desta proteína com a presença destes fatores (tabela 14).



**Figura 13: Imunorreatividade de Patched no compartimento celular.** Apenas marcação citoplasmática foi observada (A, B, C e D). Barra de escala=20  $\mu$ m.

**Tabela 14: Comparação entre os fatores preditivos e o escore para PTCH.**

<b>Fatores Preditivos</b>		<b>Escore PTCH</b>		<b>Valor p*</b>
		<b>Diferente de 4</b>	<b>Igual a 4</b>	
Presença de Figuras Mitóticas	Sim	6 (23.1)	20 (76.9)	0.999
	Não	0 (0.0)	1 (100.0)	
Presença de Microcistos	Sim	2 (40.0)	3 (60.0)	0.303
	Não	4 (18.2)	18 (81.8)	
Presença de Brotamento	Sim	3 (20.0)	12 (80.0)	0.999
	Não	3 (25.0)	9 (75.0)	
Presença de Ilhas epiteliais	Sim	1 (6.7)	14 (93.3)	0.060
	Não	5 (41.7)	7 (58.3)	

\* Teste Exato de Fisher.

Nota: Entre parênteses as porcentagens.

## 6 Discussão

O Tumor Odontogênico Ceratocístico (KCOT) é um dos mais prevalentes tumores odontogênicos (GOMES, DINIZ & GOMEZ; 2009). Seu comportamento agressivo e a alta taxa de recorrência refletem seu potencial neoplásico. Múltiplos KCOTs são uma das características da síndrome do Carcinoma Nevoide Basocelular (NBCCS) (PHILIPSEN, 2005).

Ao analisarmos os dados epidemiológicos, verificamos que os pacientes desta pesquisa foram distribuídos em sua maioria entre a 3ª, 4ª e 5ª décadas de vida. A literatura mostra que o pico de idade ocorre entre a 2ª e a 3ª década de vida (GROSSMANN et al, 2007; GONZÁLEZ- ALVA et al, 2008), porém, outros trabalhos também encontraram resultados diferentes, com pico entre a 2ª e 4ª décadas (LEITE, MEIRELLES JR & JANINI, 2011; CHIRAPATHOMSAKUL, SASTRAVAHA & JANSISYANONT, 2006). Acreditamos que estes valores têm relação com a época em que é feito o diagnóstico, que pode ser tardia, uma vez que este tumor é assintomático. Além disso, nossa amostra teve um número de pacientes limitado (N=19).

Quanto à distribuição por gênero, houve ligeiro predomínio de indivíduos do sexo feminino, embora a literatura relate predomínio do gênero oposto (YAGYUU et al, 2008; LEITE, MEIRELLES JR & JANINI, 2011; BOFFANO et al, 2010). No entanto, há estudos que encontraram o mesmo resultado que o nosso (MISAKI et al, 2004; CHIRAPATHOMSAKUL, SASTRAVAHA & JANSISYANONT; 2006). A maior parte de nossa amostra foi composta de pacientes brancos e não-sindrômicos.

Em nosso estudo, a maioria dos KCOTs está localizada na mandíbula, corroborando com outros trabalhos encontrados na literatura (YAGYUU et al, 2008; KADLUB et al, 2013; BOFFANO et al, 2010; ZHAO et al, 2012; LEITE, MEIRELLES JR & JANINI, 2011; MISAKI et al, 2004). Quanto aos tumores não sindrômicos, houve predileção pela região anterior na maxila. Outros relatos indicam que estes tumores podem ocorrer em qualquer área dos maxilares, incluindo a linha média na maxila, na região previamente designada “área globulomaxilar” (BRANNON, 1976; FORSELL, 1980). Entre os tumores sindrômicos, a região de molares foi preferencialmente acometida na maxila. Já

na mandíbula, a maior parte das lesões (ambos os tipos) está localizada na região de corpo, podendo se estender a outras regiões, o que é esperado, uma vez que o KCOT cresce através da medula óssea, se estendendo da região anterior à posterior na mandíbula, permitindo que ele alcance grandes dimensões sem expansão óssea significativa. Leite, Meirelles Jr e Janini encontraram que a área mais comum foi corpo e/ou ramo da mandíbula (LEITE, MEIRELLES JR & JANINI, 2011). Boffano et al verificaram que a região de ramo e ângulo mandibular foram os sítios mais freqüentemente envolvidos (BOFFANO et al, 2010).

Em relação às características histopatológicas, algumas delas estiveram presentes principalmente em tumores sindrômicos, como figuras mitóticas, microcistos, brotamento e ilhas de epitélio odontogênico, o que está de acordo com dados da literatura, que demonstram que o KCOT, quando associado a NBCCS, mostra um número maior de ninhos satélite, áreas sólidas de proliferação epitelial e restos epiteliais odontogênicos dentro da cápsula fibrosa do que é frequentemente encontrado no tipo não-sindrômico. Esta observação pode ter uma relação com a maior taxa de recorrência descrita no tipo sindrômico (MELO et al, 2004; MARX, 2003).

Misaki et al constataram a presença destas características (exceto presença de figuras mitóticas) em lesões de pacientes sindrômicos, porém em porcentagens menores (MISAKI et al, 2004). No trabalho de Leite, Meirelles Jr e Janini, ilhas e/ou cordões de epitélio odontogênico e cistos-filha estiveram em maior porcentagem ao compararmos com nossos casos não-sindrômicos (LEITE, MEIRELLES JR & JANINI, 2011).

Yagyuu et al, em sua amostra de pacientes não-sindrômicos verificaram que 13,33% apresentaram ilhas epiteliais e/ou cistos-filha. Este número foi inferior ao que nós encontramos para ilhas epiteliais (YAGYUU et al, 2008). Kadlub et al ao analisarem KCOTs sindrômicos e não-sindrômicos verificaram que brotamento e ilhas epiteliais foram encontrados em todos os casos sindrômicos. Cistos-filha estiveram presentes em 80% dos casos. Em KCOTs não-sindrômicos, brotamento esteve presente em 20% dos casos e cistos-filha não foram encontrados (KADLUB et al, 2013).



Embora a porcentagem numérica das características analisadas possa variar de um estudo para o outro, pudemos constatar que nossos resultados corroboraram com outros trabalhos acerca da variante síndrômica. Em nosso estudo, não houve relação entre a expressão aumentada de Patched com a presença de fatores preditivos, o que acreditamos ser devido a forte expressão desta proteína na maior parte dos tumores da amostra, independente da presença destes fatores.

Quanto à recidiva, esta não foi encontrada em nenhum dos tumores analisados, apesar dos valores encontrados nos achados histopatológicos. Acreditamos que isto se deva ao sucesso na realização da técnica cirúrgica, que preconiza a remoção cuidadosa do tumor, que tem como característica uma cápsula friável. Uma remoção incompleta da lesão pode contribuir para a sua recorrência. Além disso, a literatura recomenda alguns anos de acompanhamento (*follow up*) destes pacientes após a remoção do tumor, uma vez que a recidiva pode não ocorrer imediatamente. Em nosso estudo, os pacientes com KCOTs diagnosticados em um período mais recente (de 2008 a 2012) ainda necessitam de acompanhamento.

No que tange ao desenvolvimento e progressão do tumor, os mastócitos parecem desempenhar papel importante nesses processos. O seu recrutamento precoce no microambiente tumoral e funções multifatoriais que eles são capazes de executar justificam o crescente interesse que estas células foram atraindo neste campo da pesquisa (RIBATTI & CRIVELLATO, 2012).

Em nossa análise da quantidade de mastócitos presentes em lesões síndrômicas e não-síndrômicas, verificou-se que não houve diferença significativa no valor encontrado entre estas duas variantes, resultado diferente do que foi encontrado no estudo de Pereira et al, no qual os valores de mastócitos foram significativamente maiores em KCOTs síndrômicos do que em KCOTs não-síndrômicos. Além disso, KCOTs síndrômicos mostraram uma média maior de mastócitos quando comparados com os outros tumores da amostra (PEREIRA et al, 2011).



Chatterjee et al analisaram mastócitos em cisto dentígero, cisto radicular e KCOT, os quais foram contados em 4 áreas: zona epitelial, zona sub-epitelial, zona intermediária e zona profunda. Os resultados, mostraram uma grande concentração de mastócitos na zona subepitelial em todas as paredes das lesões. Esta concentração foi maior em KCOTs do que em cistos dentígeros e radiculares (CHATTERJEE et al, 2008).

Em nosso estudo buscamos quantificar mastócitos e verificar a distribuição destas células em KCOTs síndrômicos e não síndrômicos. Porém, há poucos trabalhos na literatura que relacionam mastócitos com este tumor. Em trabalhos com amostras de cisto periapical inflamatório e granuloma periapical, constatou-se que o número de mastócitos presente nos cistos foi estatisticamente superior ao encontrado nos granulomas (FONSECA-SILVA et al, 2012; DRAZIC, SOPTA & MINIC, 2010; RODINI, BATISTA & LARA, 2004). A presença de mastócitos em lesões periapicais inflamatórias pode estar relacionada com a progressão da lesão na vasodilatação, produção de proteoglicanos, resposta angiogênica, síntese de colágeno, a regulação da inflamação, reabsorção óssea e aumento do fluido cístico (LEDESMA-MONTES et al, 2004, RODINI, BATISTA & LARA, 2004).

Há diversas pesquisas que mostram a relação entre mastócitos e neoplasias, ou mesmo lesões cancerizáveis. Estas células foram analisados em carcinoma oral de células escamosas, leucoplasia sem displasia e leucoplasia com displasia (displasia leve, moderada e grave). Mastócitos foram observados na lâmina própria povoando fortemente áreas em torno das margens do tumor, na periferia do tumor e na haste de lesão quando esta existiu. Aumento do número de mastócitos também foi encontrado em áreas de alta vascularização ("*hot spots*"). A densidade de mastócitos foi contada em todos os tecidos. Em tecidos orais normais a média foi de 1,32; em leucoplasia sem displasia 4,55; em leucoplasias com displasia 7,11; e em carcinoma a média foi de 9,33 (MICHAILIDOU, MARKOPOULOS & ANTONIADES, 2008). Abundantes mastócitos estão intimamente associados com os vasos sanguíneos ao redor de tumores sólidos e muitas vezes se correlacionam com o reforço da angiogênese tumoral e pobre prognóstico (TAKANAMI, TAKEUCHI & NARUKE, 2000). Deste modo, tem sido proposto que a inibição da função

desta célula pode ser uma modalidade terapêutica atraente no tratamento de tumores sólidos (MALTBY, KHAZAIE & MCNAGNY, 2009).

Em nosso estudo, esperávamos encontrar um número maior de mastócitos nos tumores sindrômicos, uma vez que estes apresentam fenótipo mais agressivo, como maior taxa de recorrência. Nossos resultados sugerem que estas células, que estão envolvidas na angiogênese de tumores, devem estar relacionadas às próprias características neoplásicas do KCOT (presente em ambas as variantes, isolada e sindrômica) como tendência à destruição local e caráter infiltrativo. Além disso, o pequeno número de pacientes sindrômicos da amostra, bem como de tumores relacionados à síndrome foi uma limitação deste estudo.

A via de sinalização Hedgehog e mutações em PTCH são bem compreendidas e explicam a patogênese de KCOTs. PTCH e SMO formam um complexo receptor na membrana da célula, que tem um efeito supressor da transdução do sinal de crescimento (MADRAS & LAPOINTE, 2008). Shear em seus estudos genéticos sobre KCOTs relatou uma associação da “mutação no gene PTCH” com ambos os tumores, sindrômicos e não-sindrômicos (SHEAR, 2002; BARRETO et al, 2000).

Em nossa análise quantitativa da expressão de patched, encontramos que a maioria dos tumores (sindrômicos e não-sindrômicos) apresentou o escore máximo de marcação. Em um trabalho de Barreto et al, no qual foram analisados KCOTs e outras lesões odontogênicas, a imunomarcação revelou a presença desta proteína em todos os cistos e tumores (BARRETO et al, 2002). No estudo de Zedan et al, composto de amostras de KCOTs sindrômicos e não-sindrômicos e cujo método de análise foi intensidade de coloração, os resultados mostraram que o epitélio de ambas as variantes do KCOT foi fortemente corado, sendo que a intensidade variou de moderadamente corado para KCOTs não-sindrômicos a moderadamente corado/fortemente corado para KCOTs sindrômicos (ZEDAN et al, 2001). No estudo de Ohki et al foi encontrado 100% de marcação fortemente positiva (mais do que 50% de células epiteliais coradas) no epitélio de KCOTs sindrômicos. Nos KCOTs não-sindrômicos, este valor foi 88,89% (OHKI et al, 2004). Para Vered et al, o

padrão de expressão de PTCH em KCOTs caracterizou-se por escores elevados (mais que 50% de células positivas) e intermediários (11-50% de células positivas) (VERED et al, 2009). Misaki et al analisaram 5 lesões síndrômicas e afirmaram que componentes epiteliais do KCOT mostraram forte marcação para PTCH1 em 4 casos (MISAKI et al, 2004). Portanto, nossos resultados encontram-se de acordo com os trabalhos da literatura semelhantes ao nosso, no qual a proteína Patched encontra-se fortemente expressa.

Embora esperássemos encontrar uma expressão maior de Patched em tumores síndrômicos, valores similares foram encontrados para as duas variantes do tumor, o que talvez se deva ao fato destes dados serem avaliados pelo sistema de escore (no qual as porcentagens são agrupadas em determinada categoria, que abrange um valor mínimo e máximo encontrado), o que facilitou a análise destes dados. Além disso, este resultado nos remete as próprias características neoplásicas da lesão, presente tanto em tumores síndrômicos como não-síndrômicos. Porém, podemos sugerir que mutações genéticas possam estar presentes neste primeiro tipo de tumor (não-síndrômico), como relata a literatura (BARRETO et al, 2000; OHKI et al, 2004, GU et al, 2006; SUN, LI & LI, 2008), bem como influenciar na expressão de Patched detectada pela técnica imuno-histoquímica (o que em nosso estudo proporcionou imunomarcação semelhante ao do KCOT presente na NBCCS), embora em estudos nos quais a imunomarcação desta proteína foi analisada simultaneamente com o seu estado mutacional, PTCH foi expressa independentemente da presença de mutações gênicas (ZEDAN et al, 2001; BARRETO et al, 2002).

Ao avaliarmos a expressão de Patched nas camadas do epitélio tumoral, também estabelecendo escores que variavam de 1 a 4, verificamos que houve predomínio do escore 4 apenas nas camadas basal e intermediária dos tumores não-síndrômicos e síndrômicos, o que talvez se deva ao fato da camada superficial não ter participação ativa no que se refere à renovação celular.

Barreto et al encontraram marcação de PTCH nas células intermediárias e superficiais do epitélio em todos KCOTs. Já a expressão na camada de

células basais foi detectada apenas em dois KCOTs, o que difere do nosso estudo, no qual a marcação da camada basal foi mais expressiva (BARRETO et al, 2002). Zedan et al mostraram que a marcação foi mais intensa nas camadas basais do epitélio em todos os KCOTs síndrômicos, enquanto que no epitélio de KCOTs não-síndrômicos apenas marcação suprabasal foi observada. Estes autores acreditam que a marcação na camada basal na variante síndrômica pode estar relacionada à maior capacidade de proliferação destes tumores (ZEDAN et al, 2001). No trabalho de Ohki et al, PTCH foi detectado no citoplasma de células basais à células superficiais dos KCOTs (OHKI et al, 2004). Vered et al encontraram que os KCOTs síndrômicos apresentaram escore alto na camada basal e intermediário nas outras camadas. Já os KCOTs não-síndrômicos apresentaram escore intermediário em todos os estratos (VERED et al, 2009). No estudo de Yagyuu et al, no qual apenas KCOTs não-síndrômicos foram analisados, imunomarcação positiva de PTCH foi detectada na camada intermédia, mas raramente nas camadas superficiais e basais (YAGYUU et al, 2008). Misaki et al analisaram lesões sinndrômicas e observaram imunoreatividade de anti-patched1 principalmente na camada de células espinhosas, sendo que na camada de células basais a imunomarcação foi fraca (MISAKI et al, 2004). Dessa forma, pudemos constatar (de acordo com outros trabalhos) que não há um padrão quanto à imunoexpressão de patched nos estratos basal, intermediário e superficial de tumores síndrômicos e não-síndrômicos.

Além disso, não foi surpreendente que a imunoexpressão de Patched nos KCOTs também tenha sido observada em brotamento, ilhas de epitélio odontogênico e cistos-filha, visto que estes elementos estão relacionados à atividade de proliferação do revestimento epitelial destes KCOTs, que por sua vez, estão relacionados à agressividade e recorrência do tumor.

Em relação à expressão de Patched na unidade celular, foi encontrada apenas marcação citoplasmática, o que está de acordo com outros trabalhos analisados (BARRETO et al, 2002; ZEDAN et al, 2001; OHKI et al 2004; YAGYUU et al, 2008). No trabalho de Misaki et al, a expressão também foi detectada na membrana plasmática, o que segundo este autor foi consistente com as características da proteína PTCH como receptor molecular de

superfície celular (MISAKI et al, 2004). É interessante notar que, apesar disso, a maioria dos trabalhos pôde demonstrar imunomarcação de Patched apenas no citoplasma. É possível que os níveis de expressão desta proteína na superfície da membrana sejam baixos devido à inabilidade de detectá-la neste local com a técnica utilizada. Os níveis citoplasmáticos, todavia, seriam mais expressivos, visto que Patched é um gene alvo da ativação da via, levando à expressão dessa proteína a níveis detectáveis. Para constatação da marcação membranar, experimentos futuros poderiam ser sugeridos utilizando-se o fracionamento celular, seguido de isolamento da membrana plasmática através de centrifugação. A imunodeteção de Patched nessas amostras isoladas através de western-blot seria uma alternativa para a detecção da expressão membranar.

## 7 Conclusão

- A maioria dos tumores é proveniente de pacientes brancos, não síndrômicos e foi localizada principalmente na mandíbula;
- As características histopatológicas do KCOT foram mais evidentes em tumores síndrômicos, principalmente presença de figuras mitóticas, cistos-filha, brotamento e ilhas de epitélio odontogênico, o que serve como fator preditor da agressividade desta variante;
- Não houve diferença significativa na quantidade de mastócitos presente em KCOTs isolados e associados a NBCCS, o que reflete a natureza neoplásica de ambas as variantes deste tumor;
- A maioria dos KCOTs síndrômicos e não síndrômicos apresentou forte imunomarcação de Patched. As camadas epiteliais basais e intermediárias apresentaram maior marcação quando comparadas à camada superficial, o que aponta o papel de patched na renovação celular que ocorre nestes estratos;
- Na unidade celular, apenas marcação citoplasmática foi encontrada, indicando que a expressão da proteína neste local está acentuada;
- A forte expressão epitelial de Patched em KCOTs sugere que esta proteína parece ser importante para a patogênese destes tumores, principalmente quando observada em regiões de brotamento e cistos-filha.

## 8 Referências

- ACIKALIN, M.F.; ONER, U.; TOPCU, I.; YASAR, B.; KIPER, H.; COLAK, E. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas. **Dig Liver Dis**, v.37, p.162-9, 2005.
- ADOLPHE, C.; HETHERINGTON, R.; ELLIS, T. ET AL. Patched1 Functions as a Gatekeeper by Promoting Cell Cycle Progression. **Cancer Res**, Queensland, v.66, n.4, p.2081-8, 2006.
- AHLFORS, E.; LARSSON, A.; SJOGREN, S. The odontogenic keratocyst: a benign cystic tumor? **J Oral Maxillofac Surg**, v.42, p.10–9, 1984.
- AULUCK, A.; PAI, K.M. Treatment of recurrent odontogenic keratocyst: a known but forgotten point. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.44, n.74–5, 2006.
- BAI, C. B.; JOYNER, A. L. Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. **Development**, v.128, p.5161–5172, 2001.
- BALE, A.E.; YU, K-P. The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. **Hum Mol Genet**, v.10, p.757–62, 2001.
- BARRETO, D.C.; BALE, A.E.; DE MARCO, L.; GOMEZ,R.S. Immunolocalization of PTCH protein in odontogenic cysts and tumors. **J Dent Res**, v.81, n. 757–60, 2002.
- BARRETO, D.C.; GOMEZ, R.S; BALE, A.E.; BOSON, W.L.; DE MARCO, L. PTCH gene mutation in odontogenic keratocysts. **J Dent Res**, v.79, p.1418–22, 2000.
- BERMAN, D.M.; KARHADKAR ,S.S.; MAITRA, A. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. **Nature**, v.425, n.846–851, 2003.
- BERMAN, D.M.; KARHADKAR, S.S.; HALLAHAN, A.R.; PRITCHARD,J.I.; EBERHART, C.G.; WATKINS, D.N. ET AL. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. **Science**, v.297, p.1559-1561, 2002.
- BITGOOD, M.J.; MCMAHON, A.P. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. **Dev Biol**, v.172, p.126-138, 1995.
- BOFFANO, P.; RUGA, E.; GALLESIO, C. Keratocystic Odontogenic Tumor (Odontogenic Keratocyst): Preliminary Retrospective Review of Epidemiologic, Clinical, and Radiologic Features of 261 Lesions From University of Turin. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, p.2994-2999, 2010.

- BOWREY, P.; KING, J.; MAGAREY, C. ET AL. Histamine, mast cells and tumour cell proliferation in breast cancer: does preoperative cimetidine administration have an effect? **Brit J Cancer**, v.82, p.167-70, 2000.
- BRANNON, R.B. The odontogenic keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases. Part I. Clinical features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.42, p.54–72, 1976.
- BRANNON, R.B. The odontogenic keratocyst. A clinicopathological study of 312 cases: Part II. Histologic features. **Oral Surg**, v. 43, p.233–25, 1977.
- CARPENTER, D.; STONE, D.M.; BRUSH, J.; RYAN, A.; ARMANINI, M.; FRANTZ, G. ET AL. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v. 95, p.13630-13634, 1998.
- CHATTERJEE, S.; MAHAJAN, S.; BOAZ, K.; GEORGE, T. Quantitative role of mast cells in odontogenic cystic enlargement. **Braz J Oral Sci.**, v. 7, n. 27, p.1662-65, 2008.
- CHEN, J.K.; TAIPALE, J.; COOPER, M.K. ET AL. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. **Genes Dev**, v.16, p.2743- 2748, 2002.
- CHEN, J.K.; TAIPALE, J.; YOUNG, K.E.; MAITI, T.; BEACHY, P.A. Small molecule modulation of smoothened activity. **Proc. Natl Acad. Sci.**, USA, v. 99, p.14071–14076, 2002.
- CHIRAPATHOMSAKUL, D.; SASTRAVAHA, P.; JANSISYANONT, P. A review of odontogenic keratocysts and the behavior of recurrences. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v.10, n.1, p.5-9, 2006.
- CHUANG, P. T.; MCMAHON, A. P. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. **Nature**, London, v. 397, p.617–621, 1999.
- COOPER, M.K; PORTER, J.A.; YOUNG, K.E.; BEACHY, P.A. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. **Science**, v.280, p.1603–1607, 1998.
- COTTOM, H.E.; BSHENA, F.I.; SPEIGHT, P.M.; CRAIG, G.T.; JONES, A.V. Histopathological features that predict the recurrence of odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v.41, p.408-14, 2012.
- CRIVELLATO, E.; BELTRAMI, C.A.; MALLARDI, F.; RIBATTI D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? **Histol Histopathol**, v.19, n.1, p.259-70, 2004.



CRIVELLATO, E.; RIBATTI, D. Involvement of mast cells in angiogenesis and chronic inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.4, n.1, p.9-11, 2005.

CRIVELLATO, E.; NICO, B.; RIBATTI, D. Mast cell contribution to tumor angiogenesis: a clinical approach. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 20, n.4, p.197-206, 2009.

DASSULE, H.R.; LEWIS, P.; BEI, M.; MAAS, R.; MCMAHON, A.P. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. **Development**, v.127, p.4775-4785, 2000.

DAYA-GROSJEAN, L.; COUVE´-PRIVAT, S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. **Cancer Letters**, v.225, p.181–192, 2005.

DRAZIC, R.; SOPTA, J.; MINIC´, A.J. Mast cells in periapical lesions: potential role in their pathogenesis. **J Oral Pathol Med**, v.39, p.257–262, 2010.

DVORAK, A.M. Ultrastructural studies of human basophils and mast cells. **J. Histochem. Cytochem.**, v.53, p.1043–1070, 2005.

ELPEK, G.; GELEN, T.; AKSOY, N.H. ET AL. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. **J Clin Pathol**, v.54, n.12, p.940-4, 2001.

EPSTEIN, E.H. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. **Nat Rev Cancer.**, v.8, p.743–54, 2008.

ERYILMAZ, T.; OZMEN, S.; FINDIKCIOGLU, K.; KANDAL, S.; ARAL, M. Odontogenic keratocyst: an unusual location and review of the literature. **Ann Plast Surg**, v.62, n.2, p.210–212, 2009.

FAN, C.M.; TESSIER-LAVIGNE, M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. **Cell.**, v.79, p.1175-86, 1994.

FONSECA-SILVA, T.; SANTOS, C. C. O. ; ALVES, L. R.; DIAS, L. C.; BRITO-JÚNIOR, M.; DE PAULA, A. M. B.; GUIMARÃES, A. L. S. Detection and quantification of mast cell, vascular endothelial growth factor, and microvessel density in human inflammatory periapical cysts and granulomas. **International Endodontic Journal**, v.45, p.859–864, 2012.

FORSSELL, K. The primordial cyst. A clinical and radiographic study. **Proc Finn Dent Soc**, v.76, p.129–74, 1980.

FRANK-KAMENETSKY, M.; ZHANG, X.M.; BOTTEGA, S.; GUICHERIT, O.; WICHTERLE, H.; DUDEK, H. ET AL. Smallmolecule modulators of Hedgehog

signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. **J. Biol.**, v.1, p.10.1–10.19, 2002.

GOMES, C.C.; DINIZ, M.G.; GOMEZ, R.S. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. **Oral Oncology**, v. 45, p.1011-1014, 2009.

GONZÁLEZ-ALVA, P.; TANAKA, A.; OKU, Y.; YOSHIZAWA, D.; ITOH, S.; SAKASHITA, H.; IDE, F.; TAJIMA, Y.; KUSAMA, K. Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective study of 183 cases. **J Oral Sci**, v. 50, n.2, p.205–212, 2008.

GOODRICH, L. V., MILENKOVIC, L., HIGGINS, K.M.; SCOTT, M. P. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants, **Science**, v.277, p.1109-1113, 1997.

GOODRICH, L. V.; JOHNSON, R. L.; MILENKOVIC, L.; MCMAHON, J. A.; SCOTT, M. P. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. **Genes Dev.**, v.10, p.301–312, 1996.

GRIMBALDESTON, M.A.; NAKAE, S.; KALESNIKOFF, K.; TSAI, M.; GALLI, S.J. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. **Nat. Immunol.**, v. 38, p.1095–1104, 2007.

GROSSMANN, S.M.; MACHADO, V.C.; XAVIER, G.M.; MOURA, M.D.; GOMEZ, R.S.; AGUIAR, M.C.F.; MESQUITA, R.A. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in a Brazilian population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 104, p.e35-e41, 2007

GU, X.M.; ZHAO, H.S.; SUN, L.S.; LI, T.J. PTCH mutations in sporadic and Gorlin-syndrome-related odontogenic keratocysts. **J Dent Res**, v.85, p.859–63, 2006.

GULUBOVA, M.; VLAYKOVA, T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. **J Gastroenterol Hepatol**, v.24, p.1265-75, 2009.

HAHN, H.; WICKING C.; ZAPHIROPOULOUS, P.G.; ET AL. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Cell**, v.85, p.841–51, 1996.

HE, H-C.; CHEN, J-H.; CHEN, X-B.; QIN, G-G.; MCAI, C.; LIANG, Y-X.; HAN, Z-D.; DAI, Q-S.; CHEN, Y-R.; ZENG, G-H.; ZHU, J-G.; JIANG, F-N.; ZHONG, W-D. Expression of Hedgehog Pathway Components is Associated with Bladder

Cancer Progression and Clinical Outcome. **Pathol. Oncol. Res.**, v.18, p.349–355, 2012.

HERETSCH, P.; TZAGKAROULAKI, L.; GIANNIS, A. Modulators of the hedgehog signaling pathway. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, 6613–6624, 2010.

HIGH, A; ZEDAN, W. Basal cell nevus syndrome. **Curr Opin Oncol**, v.17, p.160–6, 2005.

HIME, G.R.; LADA, H.; FIETZ, M.J.; GILLIES, S.; PASSMORE, A.; WICKING, C. ET AL. Functional analysis in *Drosophila* indicates that the NBCCS/ PTCH1 mutation G509V results in activation of smoothened through a dominant-negative mechanism. **Dev Dyn**, v. 229, p.780-790, 2004.

HOOPER, J.E.; SCOTT, M.P. Communicating with Hedgehogs. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.6, p.306–17, 2005.

HOOPER, J.E.; SCOTT, M.P. The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for a segmental patterning. **Cell**, v.59, p.751-765, 1989.

IAMAROON, A.; PONQSIRIWET, S.; JITTIDECHARAKS, S. ET AL. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.32, n.4, p.195-9, 2003.

INCARDONA, J.P.; GAFFIELD, W.; KAPUR, R.P.; ROELINK, H. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. **Development**, v.125, p.3553–3562, 1998.

INGHAM, P.W.; MCMAHON, A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes Dev.**, v.15, p.3059–3087, 2001.

IRANI, A.M.; SCHECHTER, N.M.; CRAIG, S.S.; DE BLOIS, G.; SCHWARTZ, L.B. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease composition. **Proc. Natl Acad. Sci., USA**, v. 83, p.4464–4468, 1986.

JOHNSON, R.L.; ROTHMAN, A.L.; XIE, J.; GOODRICH, L.V.; BARE, J.W.; BONIFAS, J.M. ET AL. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. **Science**, v.272, p.1668-1671, 1996.

JORDAN, R.C.K. Histology and ultrastructural features of odontogenic keratocyst. **Oral Maxillofac Surg Clin N Am**, v.15, p.325-33, 2003.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2008.

- KADLUB, N.; COUDERT, A.; GATIBELZA, M.E; EL HOUMAMI, N.; SOUFIR, N.; RUHIN-PONCET, B.; L'HERMINE, A.C.; BERDAL, A.; VAZQUEZ, M.P.; DESCROIX, V.; PICARD, A. PTCH1 mutation and local aggressiveness of odontogenic keratocystic tumors in children: is there a relationship? **Human Pathology**, p.1-8, 2013.
- KALRA, M.; RAO, N.; NANDA, K.; REHMAN, F.; GIRISH, K.L.; TIPPU, S.; ARORA, S. The role of mast cells on angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, India, v.17, n. 2, p.190-6, 2012.
- KANKKUNEN, J.P.; HARVIMA, I.T.; NAUKKARINEN, A. Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. **Int J Cancer**, v. 72, p.385-8, 1997.
- KNUDSON JR, A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 68, p.820-823,1971.
- KUBOTA, Y.; OKA, S.; NAKAGAWA, S.; SHIRASUNA, K. Interleukin-1alpha enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. **J Dent Res.**, v.81, p.23-7, 2002.
- LAUTH, M.; BERGSTROM, A.; SHIMOKAWA, T.; TOFTGARD, R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by smallmolecule antagonists. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.104, p.8455- 8460, 2007.
- LEDESMA-MONTES, C.; GARCÉS-ORTÍZ, M.; ROSALES-GARCÍA, G.; HERNÁNDEZ-GUERRERO, J.C. Importance of Mast Cells in Human Periapical Inflammatory Lesions. **Journal Of Endodontics**, v.30, n.12, p.855-859, 2004.
- LEITE, T.C.; MEIRELLES JR., V.; JANINI, M.E.R. Odontogenic Keratocystic Tumor: Clinical and Histopathologic Retrospective Study Based on the New WHO Classification. **Int. J. Odontostomat.**, v.5, n.3, p.227-234, 2011.
- LENCH, N.J.; TELFORD, E.A.; HIGH, A.S.; MARKHAM, A.F.; WICKING, C; WAINWRIGHT, B.J. Characterization of human patched germ line mutations in nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Hum Genet**, v.100, p.497–502, 1997.
- LENCH, N.J.; HIGH, A.S.; MARKHAM, A.F.; HUME, W.J.; ROBINSON PA. Investigation of chromosome 9q22.3-q31 DNA marker loss in odontogenic keratocysts. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v.32B, p.202–6, 1996.
- LEVANAT, S.; GORLIN, R.J.; FALLET, S.; JOHNSON,D.R.; FANTASIA, J.E.; BALE, A.E. A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. **Nat Genet**, v. 12, p.85-87, 1996.

LI, J.; WU, T.; LU, J.; CAO, Y.; SONG, N.; YANG, T.; DONG, R.; YANG, Y.; ZANG, L.; DU, X.; WANG, S. Immunohistochemical evidence of the prognostic value of hedgehog pathway components in primary gallbladder carcinoma. **Surg Today**, v.42, p.770–775, 2012.

LI, T.J. The Odontogenic Keratocyst: A Cyst, or a Cystic Neoplasm? **Journal of Dental Research**, China, 22 abr. 2011. Disponível em: <<http://jdr.sagepub.com/content/90/2/133>>. Acesso em: 07 fev 2012.

LI, T.J.; YUAN, J.W.; GU, X.M.; ZHAO, H.S. PTCH germline mutations in Chinese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. **Oral Dis**, v.14, p.174-179, 2008.

LINDSTROM, E.; SHIMOKAWA, T.; TOFTGARD, R.; ZAPHIROPOULOS, P.G. PTCH mutations: distribution and analyses. **Hum Mutat**, v.27, p.215–9, 2006

LO MUZIO, L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). **Orphanet J Rare Dis**, v.3, p.32-48, 2008.

LUM, L., BEACHY, P.A. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. **Science**, v.304, p.1755-9, 2004.

MA, X.; CHEN, K.; HUANG, S. Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. **Carcinogenesis**, v. 26, p.1698–705, 2005.

MADRAS, J; LAPOINTE, H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. **J Can Dent Assoc**, v.74, n.2, p.165–165h, 2008.

MAHINDROO, N.; PUNCHIHEWA, C.; FUJII, N. Hedgehog-Gli Signaling Pathway Inhibitors as Anticancer Agents. **J. Med. Chem.**, v.52, p. 3829-3845, 2009.

MAKOWSKI, G.J.; MCGUFF, S.; VAN SICKELS, J.E. Squamous cell carcinoma in a maxillary odontogenic keratocyst. **J Oral Maxillofac Surg**, v.59, p.76–80, 2001.

MALTBY, S.; KHAZAIE, K.; MCNAGNY K.M. Mast Cells in Tumor Growth: Angiogenesis, Tissue Remodeling and Immune-modulation. **Biochim Biophys Acta**, Canadá, v.1796, n. 1, p. 19-26, 2010.

MARIGO, V.; SCOTT, M. P.; JOHNSON, R. L.; GOODRICH, L. V.; TABIN, C. J. Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. **Development**, v.122, p.1225–1233, 1996.

- MARX, R SD. **Contemporary oral and maxillofacial surgery**. Chicago: Mosby, p. 509-604, 2003.
- MAURETTE, P.E.; JORGE, J.; DE MORAES, M. Conservative treatment protocol of odontogenic keratocyst: a preliminary study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 64, p.379, 2006.
- MELO, E.S.; KAWAMURA, J.Y.; ALVES, C.A. ET AL. Imaging modality correlations of an odontogenic keratocyst in the nevoid basal cell carcinoma syndrome: a family case report. **Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Rad End**, v.98, p.232- 6, 2004.
- MENDES, R.A.; CARVALHO, J.F.; VAN DER WAAL, I. Characterization and management of keratocystic odontogenic tumor in relation to its histological and biological features. **Oral Oncol**, v.46, p.219-25, 2010.
- MENDES, R.A.; CARVALHO, J.F.C.; VAN DER WAAL, I. Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocystic odontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment – An overview. **Oral Oncology**, v.46, p.19–24, 2010.
- MICHAILIDOU, E.Z.; MARKOPOULOS, A.K.; ANTONIADES, D.Z. Mast Cells and Angiogenesis in Oral Malignant and Premalignant Lesions. **The Open Dentistry Journal**, v.2, p.126-132, 2008.
- MILLER, S.J. Biology of basal cell carcinoma. **J Am Acad Dermatol**, v.24, p.1–9, 1991.
- MISAKI, A.; SAKAMOTO, K.; OKADA, N.; TAKAGI, M. Immunohistochemical Examination of Patched and Sonic Hedgehog in Odontogenic Keratocysts Associated with Basal Cell Nevus Syndrome. **Oral Med Pathol**, v.9, p.127-132, 2004.
- MORTON, J.P.; MONGEAU, M.E.; KLIMSTRA, D.S. Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, p.5103–8, 2007.
- NEVILLE, B.W.; ALLEN, C.M.; DAMN, D.D.; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral & Maxillofacial**. 2 ed. Ed. Guanabara Koogan S.A., 2004.
- NUSSLEIN-VOLHARD, C.; WIESCHAUS, E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. **Nature**, v. 287, p.795-801, 1980.
- OHKI, K; KUMAMOTO, H; ICHINOHASAMA, R; SATO, T; TAKAHASHI, N; OOTA, K. ET AL. PTC, SMO, and GLI-1 in odontogenic keratocysts. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.33, p.584–92, 2004.

PAN, S.; DONG, Q.; SUN, L.S.; LI, T.J. Mechanisms of inactivation of PTCH1 gene in keratocystic odontogenic tumors: modification of the two-hit hypothesis. **Clin Cancer Res**, v. 16, p. 442-450, 2010.

PAN, S.; LI, T.J. PTCH1 mutations in odontogenic keratocyst: Are they related to epithelial cell proliferation? **Oral Oncol**, v. 45, p.861-865, 2009.

PASCA DI MAGLIANO, M.; HEBROK, M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. **Nat Rev Cancer**, v.3, p.903–11, 2003.

PEIFER, M.; BEJSOVEC, A. Knowing your neighbors: Cell interactions determine intersegmental patterning in Drosophila. **Trends Genet**, v. 8, p.242-248, 1992.

PEREIRA, A. C. F. ; GURGEL, C. A. ; RAMOS, E. A. ; VIDAL, M.T. ; PINHEIRO, A.L.; JURISIC, V. ; SALES, C.B.; CURY, P. R.; DOS SANTOS, J.N. Distribution of mast cells in benign odontogenic tumors. **Tumour Biol. Apr**, v.33, n.2, p.455-61, 2011.

PHILIPSEN, H.P. Odontogenic Tumours. In: BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IACR Press, 2005. p.306-7. Disponível em: < <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/bb9-chap6.pdf>> Acesso em: 28/04/2012.

PHILIPSEN, H.P. Om keratocyster (kolesteatom) i kaeberne. **Tandlaegebladet**, v. 60, p.963-981, 1956.

POGREL, M.A. The history of the odontogenic keratocyst. **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am**, v.15, p.311–315, 2003.

RAHNAMA, F.; TOFTGARD, R.; ZAPHIROPOULOS, P. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signaling **Biochem. J.**, v. 378, p.325–334, 2004.

REGEZI, J.A. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibroosseous, and giant cell lesions of the jaws. **Mod Pathol**, v.15, p.331–41, 2002.

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J.; JORDAN, R.C.K. **Patologia Oral. Correlações Clinicopatológicas**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

REICHART, P.A.; PHILIPSEN, H.P.; SCIUBBA, J.J. The new classification of Head and Neck Tumours (WHO)—any changes? **Oral Oncology**, p.757– 758, 2006.

REIFENBERGER, J.; WOLTER, M.; WEBER, R.G.; MEGAHED, M.; RUZICKA, T.; LICHTER, P. et al. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell

carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. **Cancer Res**, v. 58, p.1798-1803, 1998.

RIBATTI, D. Genetic and epigenetic mechanisms in the early development of the vascular system. **J. Anat.**, v.208, 139–152, 2006.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822, p. 2–8, 2012.

RIOBO, N. A.; MANNING, D. R. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. **Biochem J.**, v.403, p.369-79, 2007.

ROBERTS, I.S. ET AL. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. **J. Clin. Pathol**, v.53, p.858–862, 2000.

RODINI, C.O.; BATISTA, A.C.; LARA, V.S. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: Possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.97, p.59-63, 2004.

RUIZ I ALTABA, A.; SANCHEZ, P.; DAHMANE, N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells, **Nat. Rev. Cancer**, v.2, p.361–372, 2002.

RUIZ, I.A.A. The works of GLI and the power of hedgehog. **Nat. Cell Biol.**, v. 1 p.E147–E148, 1999.

SCALES, S.J.; DE SAUVAGE, F.J. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.30, p.303-312, 2009.

SHEAR, M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. **Oral Oncol**, v.38, n.4, p.323–331, 2002.

SHEAR, M.; SPEIGHT, P.M. Queratocisto Odontogênico. In: **Cistos da Região Bucomaxilofacial**. 4ª ed. São Paulo: Santos, 2011.

SILVER, R.; SILVERMAN, A.J.; VITKOVIĆ, L.; LEDERHENDLER, I.I. Mast cells in the brain: evidence and functional significance. **Trends Neurosci.**, v.19, p.25–31, 1996.

SMYTH, I.; NARANG, M.A.; EVANS, T.; HEIMANN, C.; NAKAMURA, Y.; CHENEVIX-TRENCH, G. ET AL. Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumor suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. **Hum Mol Genet**, v. 8, p.291-297, 1999.



SONG, Y.L.; ZHANG, W.F.; PENG, B.; WANG, C.N.; WANG, Q.; BIAN, Z. Germline mutations of the PTCH gene in families with odontogenic keratocysts and nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Tumor Biol**, v.27, p.175-180, 2006.

SOUFIR, N.; GERARD, B.; PORTELA, M. ET AL. PTCH mutations and deletions in patients with typical nevoid basal cell carcinoma syndrome and in patients with a suspected genetic predisposition to basal cell carcinoma: a French study. **Br J Cancer**, v.95, p.548–53, 2006.

STANTON, B.Z.; PENG, L.F.; MALOOF, N.; NAKAI, K.; WANG, X.; DUFFNER, J.L.; TAVERAS, K.M.; HYMAN, J.M.; LEE, S.W.; KOEHLER, A.N.; CHEN, J.K.; FOX, J.L.; MANDINOVA, A.; SCHREIBER, S.L. A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. **Nat. Chem Biol.**, v.5, p.154-156, 2009.

STOELINGA, P.J. Long-term follow-up on keratocysts treated according to a defined protocol. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.30, p.14–25, 2001.

STOELINGA, P.J.W. Etiology and pathogenesis of keratocysts. **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am**, v.15, p.317–324, 2003.

SUN, L.S.; LI, X.F.; LI, T.J. PTCH1 and SMO gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. **J Dent Res**, v.87, p. 575–9, 2008.

TAIPALE, J.; CHEN, J.K.; COOPER, M.K.; WANG, B. ; MANN, R.K.; MILENKOVIC, L. ET AL. Effects of oncogenic mutations in smoothened and patched can be reversed by cyclopamine. **Nature**, v.406, p.1005–1009, 2000.

TAKANAMI, I.; TAKEUCHI, K.; NARUKE, M. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. **Cancer**, v.88, p. 2686-2692, 2000.

TANG, J.Y. Elucidating the Role of Molecular Signaling Pathways in the Tumorigenesis of Basal Cell Carcinoma. **Semin Cutan Med Surg**, v. 30, p.S6-S9, 2011.

TERONEN, O.; SALO, T.; LAITINEN, J.; TORNWALL, J.; YLIPAAVALNIEMI, P.; KONTTINEN, Y.T. ET AL. Characterization of interstitial collagenases in jaw cyst wall. **Eur J Oral Sci.**, v.103, p.141-7, 1995.

THAYER, S.P.; DI MAGLIANO, M.P.; HEISER, P.W. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. **Nature**, v. 425, p.851–856, 2003.

TODD, R. Molecular approaches to the diagnosis of sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome associated odontogenic keratocysts. **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am**, n. 15, p.447–61, 2003.

TOFTGARD, R. Hedgehog signalling in cancer. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, p.1720-1731, 2000.

TOMITA, M.; MATSUZAKI, Y.; EDAGAWA, M. ET AL. Association of mast cells with tumor angiogenesis in esophageal squamous cell carcinoma. **Dis Esophagus**, v.14, n.2, p.135-8, 2001.

VARJOSALO, M.; TAIPALE, J. Hedgehog: functions and mechanisms. **Genes Dev.**, v.22, p.2454-2472, 2008.

VERED, M.; PELEG, O.; TAICHER, S.; BUCHNER, A. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. **J Oral Pathol Med**, v.38, p.597–604, 2009.

VILLAVICENCIO, E.H.; WALTERHOUSE, D.O.; IANNACCONE, P.M. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. **Am J Hum Genet**, v.67, p.1047-54, 2000.

VOGT, A.; CHUANG, P.T.; HEBERT, J.; HWANG, J.; LU, Y.; KOPELOVICH, L. ET AL. Immunoprevention of basal cell carcinomas with recombinant hedgehog-interacting protein. **J. Exp. Med.**, v.199, p.753–761, 2004.

VON HOFF, D.D.; LORUSSO, P.M.; RUDIN, C.M. ET AL. Inhibition of the Hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. **N Engl J Med**, v.361, p.1164-1172, 2009.

WELLER, K.; FOITZIK, K.; PAUS, R.; SYSKA, W.; MAURER, M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **FASEB J.**, v.20, p.2366–2368, 2006.

WETMORE, C.; EBERHART, D.E.; CURRAN, T. The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched. **Cancer Res**, v. 60, p.239-246, 2000.

WILLIAMS, J.A.; GUICHERIT, O.M.; ZAHARIAN, B.I.; XU, Y.; CHAI, L.; WICHTERLE, H. ET AL. Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. **Proc. Natl Acad. Sci.**, USA, v. 4, p.4616–4621, 2003.

WILLIAMS, J.A.; GUICHERIT, O.M.; ZAHARIAN, B.I.; XU, Y.; CHAI, L.; WICHTERLE, H. ET AL. Identification of a small molecule inhibitor of the

Hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v.100, p.4616-4621, 2003.

WOOLGAR, J.A.; RIPPIN, J.W.; BROWNE, R.M. The odontogenic keratocyst and its occurrence in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.64, p.727–30, 1987.

YAGYUU, T.; KIRITA, T.; SASAHIRA, T.; MORIWAKA, Y.; YAMAMOTO, K.; KUNIYASU, H. Recurrence of Keratocystic Odontogenic Tumor: Clinicopathological Features and Immunohistochemical Study of the Hedgehog Signaling Pathway. **Pathobiology**, v.75, p.171–176, 2008.

YAMAGO, G.; TAKATA, Y.; FURUTA, I.; URASE, K.; MOMOI, T.; HUH, N. Suppression of hair follicle development inhibits induction of sonic hedgehog, patched, and patched-2 in hair germs in mice. **Arch. Dermatol. Res.**, v.293, 435–441, 2001.

YANAI, K.; NAGAI, S.; WADA, J. Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer. **J Surg Oncol**, v. 95, p.55–62, 2007.

XIE, J.; MURONE, M.; LUOH, S.M.; RYAN, A.; GU, Q.; ZHANG, C. et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. **Nature**, v.391, p.90-92, 1998.

ZAPHIROPOULOS, P. G.; UNDEN, A. B.; RAHNAMA, F.; HOLLINGSWORTH, R. E.; TOFTGARD, R. PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. **Cancer Res.**, v.59, p.787–792, 1999.

ZEDAN, W.; ROBINSON, P. A.; MARKHAM, A. F.; HIGH, A. S. Expression of the Sonic Hedgehog receptor 'PATCHED' in basal cell carcinomas and odontogenic keratocysts. **Journal of Pathology**, v.194, p.473–477, 2001.

ZHANG, L.; SUN, Z.J.; ZHAO, Y.F.; BIAN, Z.; FAN, M.W.; CHEN, Z. Inhibition of SHH signaling pathway: molecular treatment strategy of odontogenic keratocyst. **Med Hypotheses**, v.67, p.1242–4, 2006.

ZHAO, Y.; LIU, B.; CHENG, G.; WANG, S-P.; WANG, Y-N. Recurrent keratocystic odontogenic tumours: report of 19 cases. **Dentomaxillofacial Radiology**, v.41, p.96–102, 2012.

ZURAWEL, R.H.; ALLEN, C.; WECHSLER-REYA, R.; SCOTT, M.P.; RAFFEL, C. Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 28, p.77-81, 2000.

# APÊNDICES



## APÊNDICE B

### CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

<b>21- Presença de camada basal de células cubóides ou colunares bem definida, frequentemente em paliçada:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>22- Presença de núcleos das células basais intensamente basofílicos, orientados no sentido contrário ao da membrana basal:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>23- Epitélio escamoso estratificado paraqueratinizado regular sem cristas epiteliais:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>24- Epitélio com 5-8 camadas de espessura:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>25- Presença de epitélio estratificado paraqueratinizado, com uma superfície frequentemente ondulada:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>26- Presença de figuras mitóticas nas camadas suprabasais:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>27- Presença de microcistos (cistos satélites ou cistos-filha):</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>28- Presença de brotamento de proliferação do epitélio:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>29- Presença de ilhas de epitélio odontogênico (em fileiras ou pequenos grumos, sem formar microcistos):</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>30- Parede fibrosa fina:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>31- Presença de infiltrado inflamatório:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>32- Perda das características celulares e arquiteturais na presença de infiltrado inflamatório:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>
<b>33- Separação da junção epitélio-conjuntivo:</b> 1- Sim    2- Não	<input type="checkbox"/>

## APÊNDICE C

Análise Quantitativa- Mastócitos	
Nº da Lâmina:	
Nº do Campo	Nº Total de Mastócitos
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
Nº Total de Campos Analisados:	Somatório do nº total de Mastócitos:

## APÊNDICE D

Análise Quantitativa - Patched		
Nº da Lâmina:		
Nº do Campo	Nº Total de Células	Nº de Células Marcadas
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
Nº Total de Campos Analisados:	Somatório do Nº Total de Células:	Somatório do Nº Total de Células Marcadas:
% de Células Marcadas:	Razão para Campo:	Razão para Campo:
Escore:		



## APÊNDICE E

Análise Qualitativa- Patched			
Nº da Lâmina:			
Nº do Campo	Camada Basal	Camada Intermediária	Camada Superficial
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
Nº Total de Campos Analisados:	Somatório do Nº de Campos:	Somatório do Nº de Campos:	Somatório do Nº de Campos:
	Razão para Campo:	Razão para Campo:	Razão para Campo:
	% de Campos Marcados:	% de Campos Marcados:	% de Campos Marcados:
	Escore:	Escore:	Escore:

## APÊNDICE F

Análise Qualitativa- Patched			
Nº da Lâmina:			
Nº do Campo	Marcação Membranar	Marcação Citoplasmática	Marcação Nuclear
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
Nº Total de Campos Analisados:			